

**Kryokonservierung und in vitro Kultur von
Pyrus pyraster (L.) BURGSD. und *Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum horticolarum (Dr. rer. hort.)**

**eingereicht an der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin**

**von Dipl.-Ing. agr. Marianne Kadolsky
geboren am 20.12.1954 in Berlin**

2005

**Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Hans-Jürgen Prömel
in Vertretung**

**Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät
Prof. Dr. Dr. h. c. Uwe Jens Nagel**

**Gutachter: 1 Prof. Dr. Frank Pohlheim
2 PD Dr. Kurt Zoglauer
3 Dr. Andreas Meier-Dinkel**

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2006

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Liste der Abkürzungen	v
1. EINLEITUNG	6
1.1. Einleitung und Aufgabenstellung	6
1.2. Stand der Wissenschaft	10
1.2.1. In vitro Kultur	10
1.2.2. Kryokonservierung	13
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. Pflanzenmaterial	19
2.1.1. <i>Pyrus pyraaster</i>	19
2.1.2. <i>Sorbus torminalis</i>	21
2.1.3. <i>Prunus avium</i>	22
2.1.4. Reisererntetermin und Reiserlagerung	22
2.2. Kulturgefäße	23
2.3. Kulturführung	24
2.3.1. Kulturräume	24
2.3.2. Gewächshaus	24
2.4. Handhabung der in vitro Kulturen	24
2.4.1. Oberflächensterilisation	24
2.4.2. Präparation der Explantate	25
2.4.3. Nährmedien	26
2.4.3.1. Zusammensetzung der Basalmedien	28
2.4.3.2. Etablierungs- und Vermehrungsmedien für <i>Pyrus pyraaster</i>	28
2.4.3.3. Etablierungs- und Vermehrungsmedien für <i>Sorbus torminalis</i>	28
2.4.3.4. Bewurzelungsmedien	29
2.4.4. Akklimatisierung und weitere Kultur	29
2.5. Bonituren, Berechnungen und Definitionen	30
2.6. KRYOKONSERVIERUNG	31
2.6.1. Technische Ausstattung	31
2.6.2. Explantatquellen und Erntetermine	31
2.6.2.1. Explantatquellen und Erntetermine für die Versuche „Einfluss der Geschwindigkeit von Gefrieren und Auftauen“ und „Einfluss von Genotyp und Individuum“	31
2.6.2.2. Winterknospen für den Versuch „Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung“	32
2.6.2.3. In vitro Kulturen	32
2.6.3. Vitalitätstests	32
2.6.3.1. TTC-Test	32
2.6.3.2. Vitalitätstest in vitro	33
2.6.4. Behandlung von Winterknospen	34
2.6.5. Behandlung von in vitro Material	35
2.6.5.1. Kälteakklimatisierung	35
2.6.5.2. Einkapseln in Alginatkugeln und Trocknen	35
2.6.5.3. Osmotische Dehydrierung	36
2.6.5.4. Untersuchungen zur Toxizität von DMSO	37
2.6.5.5. Vitrifizierung	37
2.6.5.6. Droplet-Methode	38

2.6.5.7.	Auftauen und Nachbehandlung	38
3.	ERGEBNISSE	39
3.1.	Ergebnisse von in vitro Kulturen ohne Kryokonservierung	39
3.1.1.	Etablierung	39
3.1.1.1.	Etablierung von <i>Pyrus pyraaster</i> : Evaluierung unterschiedlicher Explantatquellen	39
3.1.1.2.	Etablierung von <i>Sorbus torminalis</i> : Einfluss der Jacquiot-Vitamine	40
3.1.2.	Optimierung der Vermehrung	42
3.1.2.1.	Vermehrung von <i>Pyrus pyraaster</i> : Evaluierung von 3 Nährmedien	42
3.1.2.2.	Vermehrung von <i>Pyrus pyraaster</i> : Einfluss von Kulturgefäß und Medium	43
3.1.2.3.	Vermehrung von <i>Sorbus torminalis</i> : Einfluss des Explantattyps	44
3.1.2.4.	Vermehrung von <i>Sorbus torminalis</i> : Vergleich von Sprosskulturen unterschiedlichen Alters	45
3.1.3.	Bewurzelung und Akklimatisierung	46
3.1.3.1.	<i>Pyrus pyraaster</i> : Einfluss von Kulturgefäß und Medium auf Bewurzelung und Akklimatisierung	46
3.1.3.2.	<i>Pyrus pyraaster</i> : Einfluss von IBA und NAA auf Bewurzelung und Akklimatisierung	47
3.1.3.3.	<i>Pyrus pyraaster</i> : Einfluss ausgewählter Faktoren auf Bewurzelung und Akklimatisierung	48
3.1.3.4.	<i>Sorbus torminalis</i> : Einfluss von Graphit auf Bewurzelung und Akklimatisierung	49
3.1.4.	Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf die in vitro Kultur ...	50
3.1.4.1.	Kontaminationen	50
3.1.4.2.	Etablierung	51
3.1.4.2.1	Etablierungserfolg	51
3.1.4.2.2	Etablierungsdauer	56
3.1.4.3.	Vermehrungskoeffizienten	57
3.1.4.4.	Auswirkung der Einflüsse von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Pflanzenproduktion	58
3.2.	Ergebnisse der Kryokonservierung	61
3.2.1.	Kryokonservierung von in vitro Material	61
3.2.1.1.	Einkapselung in Alginatkugeln und Trocknung	61
3.2.1.1.1	Trocknungsmethoden	61
3.2.1.1.2	Effekte von Einkapselung, Nährmedien und Apexgröße	62
3.2.1.1.3	Effekte von Kältebehandlung, Einkapselung und Trocknung <i>Pyrus pyraaster</i>	63
3.2.1.2.	Droplet-Technik	65
3.2.1.2.1	Vorbehandlung mittels osmotischer Dehydrierung	65
3.2.1.2.2	Untersuchungen zur Toxizität von DMSO	67
3.2.1.2.3	Kombinationen von Vorbehandlungen	68
3.2.2.	Kryokonservierung von <i>Pyrus pyraaster</i> - Winterknospen	72
3.2.2.1.	Einfluss der Geschwindigkeit von Gefrieren und Auftauen	72
3.2.2.2.	Einfluss von Genotyp und Individuum	73
3.2.2.3.	Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung	74
3.2.2.3.1	Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung	74
3.2.2.3.2	Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung	77
3.2.2.3.3	Überblick über die Ergebnisse von Kapitel 3.2.2.3. Kryokonservierung von <i>Pyrus pyraaster</i> - Winterknospen, Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung ...	79
3.2.3.	Kryokonservierung von <i>Sorbus torminalis</i> - Winterknospen	80
3.2.3.1.	Einfluss der Auftautemperatur	80
3.2.3.2.	Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung	80
3.2.3.2.1	Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung	80

3.2.3.2.2	Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung.....	83
3.2.3.3.	Nachbehandlungen nach dem Auftauen	85
3.2.3.3.1	Dunkelphase kombiniert mit verschiedenen Auftautemperaturen	86
3.2.3.3.2	Aktivkohle im Nährmedium.....	86
3.2.3.3.3	Agarose.....	86
3.2.3.3.4	Gibberellinsäure GA ₃	86
3.2.4.	Kryokonservierung von <i>Prunus avium</i> -Winterknospen	88
3.2.4.1.	Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung	88
3.2.4.1.1	Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung.....	88
3.2.4.1.2	Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung.....	89
3.3.	In vitro Kultur nach Kryokonservierung	91
3.3.1.	Vermehrung von <i>Pyrus pyra</i> ster	91
3.3.2.	Bewurzelung und Akklimatisierung von <i>Pyrus pyra</i> ster	93
3.4.	Einfluss der Kryokonservierung von <i>Pyrus pyra</i> ster – Winterknospen auf die in vitro Kultur: Vergleich der Versuchsgruppen sine cryo und post cryo.....	95
3.4.1.	Etablierung	96
3.4.2.	Vermehrung.....	97
3.4.3.	Bewurzelung und Akklimatisierung.....	97
4.	DISKUSSION	99
4.1.	In vitro Kultur.....	99
4.2.	Kryokonservierung	107
5.	Literaturverzeichnis	113
	ANHANG	122
	Zusammenfassung	134
	Abstract	136
	Erklärung	138
	Danksagung.....	139

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
BAP	6-Benzylaminopurin
GA ₃	Gibberellinsäure 3
DMSO	Dimethylsulfoxid
et al.	und andere
EtOH	Ethanol
h	Stunde(n)
IBA	3-Indolbuttersäure
Hgl	Honigglas
iv	in vitro
LN	liquid nitrogen, Flüssigstickstoff
M	Molar
mL	mit Lagerung der Reiser
MS	Medium nach MURASHIGE and SKOOG (1962)
n	Anzahl
N	Normal
NAA	1-Naphthylelessigsäure
NaOCl	Natriumhypochlorit
oL	ohne Lagerung der Reiser
PVS2	Plant Vitrification Solution No. 2 nach YAMADA et al. (1991)
Tab.	Tabelle
TTC	2,3,5-Triphenyl-tetrazolium-chlorid
v/v	volume per volume
Vk	Vermehrungskoeffizient
Wgl	Weckglas
WPM	Woody Plant Medium nach LLOYD and McCOWN (1980)
w/v	weight per volume
w/w	weight per weight
xq	Mittelwert

1. EINLEITUNG

1.1. Einleitung und Aufgabenstellung

Politische Grundsatzentscheidungen zum Schutz der Artenvielfalt

Pyrus pyraster (L.) BURGSD., die Wildbirne, und *Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ, die Elsbeere, zählen zu den bedrohten Waldbaumarten. Sie gehören zu den in Deutschland heimischen Wildobst-Baumarten, die Teil des natürlichen Wald-Ökosystems sind. Ihre Erhaltung und Förderung leistet einen Beitrag zur Artenvielfalt in diesem Ökosystem.

Die bekannteste Konvention zum Schutz und zur Förderung der Artenvielfalt wurde 1992 auf der Konferenz der Vereinten Nationen in Rio de Janeiro, Brasilien, verfasst (ANONYM, 1993). Auch auf gesamt-europäischer und EU-Ebene stand seither auf mehreren Ministerkonferenzen, so u.a. in Straßburg (1990), Helsinki (1993), Lissabon (1998) und Wien (2003), die Erhaltung der Biodiversität im Mittelpunkt. Das Abkommen von Helsinki mit den Richtlinien für die Konservierung der biologischen Diversität in den Wäldern Europas wurde von 37 Staaten, das Abkommen von Wien von 40 Staaten unterzeichnet.

In Deutschland waren Konzepte zur Erhaltung von Waldgenressourcen bereits vorher entwickelt worden, ausgelöst durch die seit ca. 1980 offen zutage getretenen immissionsbedingten Waldschäden. Auf Grund eines Bundesratsbeschlusses von 1985 wurde die Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen“ gegründet, die das von ihr entwickelte, seit 1989 bestehende Programm für die Erhaltung forstlicher Genressourcen koordiniert (BUND-LÄNDER-ARBEITSGRUPPE, 1989). Das Programm wurde durch das Strategie-Papier des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten im Januar 2000 (BMELF, 2000) bestätigt. Eine Konzept-Neufassung erfolgte ebenfalls in 2000.

Die Konzepte zur Erhaltung forstlicher Genressourcen fordern eine nachhaltige Forstwirtschaft. Dazu gehört die Förderung von Mischwaldbeständen mit einem hohen Anteil an Laubbäumen. Im Rahmen der naturnahen Waldbewirtschaftung sind auch seltene Baumarten einschließlich der Wildobst-Arten zu berücksichtigen. Durch diese Änderungen in der Forstpolitik und die gleichzeitig stark gestiegenen Preise für das Holz der Wildobstbäume ist das Interesse an ihnen und die Nachfrage nach Pflanzgut gestiegen.

Vorkommen und Verbreitung, Gründe für die Gefährdung

Zu den nativen Wildobst-Baumarten in Deutschland zählen die Vertreter in den Gattungen *Malus*, *Prunus*, *Pyrus* und *Sorbus*, wie z.B. *Malus sylvestris*, *Prunus avium*, *Pyrus pyraster*, *Sorbus aucuparia*, *S. aria*, *S. torminalis* und *S. domestica*. Ebenfalls zu Wildobst gezählt werden auch die eingeführten Gattungen *Castanea* und *Juglans*. Mit Ausnahme von *Sorbus aucuparia*, die als Pionier-Baumart gilt, kommen alle genannten Arten auf nährstoffreichen und basenreichen Böden mit guter Wasserversorgung im warmen, gemäßigten Klima vor. Ihr physiologischer Optimalbereich, in dem sie bei forstlicher Pflege höchste Wachstumsleistungen erzielen würden, wird jedoch von Buchen besetzt. Auf Grund der natürlichen Konkurrenz sind sie auf trockene oder wiederholt überschwemmte Standorte ausgewichen, auch als Marginalstandorte bezeichnet.

Menschliche Aktivitäten, wie z. B. die Rodung von ca. zwei Drittel der Waldfläche Europas, intensive Nutzung der verbliebenen Wälder und die überproportionale Förderung der

ökonomisch wichtigsten Arten seit dem Mittelalter, führten zu einer Umwandlung der Laubmischwälder in Nadelwälder und trugen zur Verringerung der Populationsgrößen von Wildobstarten bei. Da sie auf dem Holzmarkt keine bedeutende Rolle spielten, blieb dieser Verdrängungsprozess lange unbemerkt. Die natürlichen Vorkommen sind heute auf kleine Gruppen von nur wenigen Individuen oder einzeln stehende Bäume beschränkt (Tabellen 1 und 2). Die Wildbirne gehört zu den sehr seltenen Arten in Norddeutschland. Sie wird in den Roten Listen der Farn- und Blütenpflanzen Niedersachsens, Bremens und Schleswig-Holsteins als gefährdet eingestuft (KLEINSCHMIT, 1998). Eine weitere Bedrohung der Wildformen von *Malus* und *Pyrus* liegt darin, dass sie leicht mit Kultursorten hybridisieren. Die Unterscheidung zwischen rezenten Wildformen, Hybriden und ausgewilderten Kulturformen stellt ein Problem dar (WAGNER, 1998). Möglichkeiten der Charakterisierung und Identifizierung von Wildformen finden sich bei WAGNER (1995) und BÜTTNER (1998).

Verwendung, ökonomische und ökologische Bedeutung

Das Holz der Wildobstbäume ist von hoher Qualität und Attraktivität. So wird z.B. Wildbirnen-Holz für Möbelfurniere und Musikinstrumente, speziell Flöten, verwendet. Es lässt sich vorzüglich dreheln, schnitzen, polieren, lackieren, nageln und schrauben (KLEINSCHMIT, 1998).

Elsbeeren-Holz ist hart, fest und elastisch und wird ebenfalls für Furniere im Möbelbau und für Musikinstrumente, sowie Maschinenteile, Schrauben, Kämmen, Pressen und ähnliches verwendet (NAMVAR und SPETHMANN, 1985). Diese Hölzer werden seit einigen Jahren verstärkt nachgefragt und erzielen zunehmend höhere Preise. 1970 wurde Birnbaumholz noch mit weniger als 100 DM/Fm (Deutsche Mark pro Festmeter) gehandelt. Heute liegen die Preise bei dem Vierfachen und darüber – Spitzenstämme erzielen über 7000 DM/Fm (KAUSCH, 1998). Die Durchschnittserlöse im Staatswald des Landes Baden-Württemberg betrugen in den Jahren 1961 bis 1970 für die Güte- und Stärkeklasse A/4 aller *Sorbus*-Arten 150,- DM (Buche: 100,- DM). Bei den Submissionen in Erfurt, Northeim, Fritzlar, Alsfeld und Schrozberg im Winter 1997/1998 lagen die Durchschnittspreise für Elsbeeren zwischen 2788,- DM und 4739,- DM (Buche: 433,- DM). Dabei wurden für Spitzenstämme mehrmals mehr als 20.000 DM bezahlt (KAUSCH, 1998). Im Jahr 2000 wurden auf der Submission in Northeim Spitzenpreise zwischen 14.400 und 16.200 DM für Elsbeeren erzielt und damit gezeigt, dass das hohe Preisniveau stabil blieb (MERTEN, 2000).

Abgesehen von ihrem ökonomischen Wert stellen Wildobstbäume ein Habitat für Insekten und Vögel dar. Sie bieten diesen und einigen Säugetieren, wie z.B. Siebenschläfer, Marder, Dachs und Igel, auch Nahrung (ROLOFF, 1998). Sie bereichern durch Form und Aussehen die Landschaft und die Waldränder und sind züchterische Ressourcen für Eigenschaften wie z.B. Resistenzen gegen Krankheiten. Obwohl sie bisher kaum genetisch untersucht wurden, ist auf Grund ihres weiten natürlichen Verbreitungsgebiets mit den unterschiedlichsten ökologischen Bedingungen, sowie ihrer hohen phänotypischen Variabilität zu vermuten, dass auch ihre genetische Variabilität sehr breit ist.

Konservierungsmaßnahmen und Versorgung mit Pflanzgut

Einen Überblick über die Ziele und Aktivitäten im Rahmen des Programms für die Erhaltung forstlicher Genressourcen geben BEHM et al. (1997). Für *Pyrus pyrastra* und *Sorbus torminalis* werden folgende Ziele verfolgt: 1) Konservierung in situ, wo immer es möglich ist, durch Ausweisung von Generhaltungsbeständen und einer auf das Erhaltungsziel

ausgerichteten Bewirtschaftung. 2) Erhaltung ex situ durch Evakuierung und Wiederherstellung von effektiven Reproduktionspopulationen mit einer großen Anzahl unterschiedlicher Genotypen, und 3) Förderung durch Produktion und Nutzung.

Tab. 1 Art und Umfang von in situ- und ex situ-Beständen von *Pyrus pyraster* in Deutschland bis Ende 1997 (ANONYM, 1998)

in situ-Bestände oder Einzelbäume:	6 Bestände auf 2,8 ha, 967 Bäume
ex situ-Bestände oder Einzelbäume:	1 Bestand auf 0,1 ha, 400 Bäume
Samenplantagen:	16 Plantagen auf 12,9 ha mit 400 Klonen aus 40 Familien
Klonarchive:	2 Archive mit 57 Klonen
Herkunftsversuche:	1 Versuch auf 0,1 ha
Nachkommenschaftsprüfungen:	41 Prüfungen auf 7,0 ha

Tab. 2 Art und Umfang von in situ- und ex situ-Beständen von *Sorbus torminalis* in Deutschland bis Ende 1997 (ANONYM, 1998)

in situ-Bestände oder Einzelbäume:	15 Bestände auf 3,5 ha, 1661 Bäume
ex situ-Bestände oder Einzelbäume:	13 Bestände auf 6,2 ha, 4707 Bäume
Samenplantagen:	8 Plantagen auf 9,6 ha mit 282 Klonen aus 100 Familien
Klonarchive:	2 Archive mit 41 Klonen
Herkunftsversuche:	1 Versuch auf 3,6 ha
Nachkommenschaftsprüfungen:	1 Prüfung auf 0,2 ha.

In Deutschland fallen Wildobstbaumarten und damit auch *Pyrus pyraster* und *Sorbus torminalis* nicht unter das Gesetz über forstliches Saat- und Pflanzgut (AID, 1990) (Ausnahme: *Prunus*). Daher kam und kommt immer wieder Material von unbekannter oder fraglicher Herkunft in den Handel, was unter ökologischen Aspekten unerwünscht ist. Um stattdessen die Verwendung von Pflanzgut hoher Qualität zu fördern, muss es in ausreichenden Mengen bereitgestellt werden, wofür das Vorhandensein geeigneter Produktionsstätten Voraussetzung ist.

Bei Wildobst können die in situ konservierten Bestände nicht als reproduktive Populationen gelten, da es sich um isoliert stehende Bäume oder sehr kleine Gruppen handelt, bei denen die Gefahr von Inzucht und Hybridisierung mit Kultursorten besteht (SOPPA, 1998). Daher kommt den ex situ angelegten Erhaltungssamenplantagen große Bedeutung im Hinblick auf die Verfügbarmachung von Wildtyp-Saatgut zu: Sie führen das genetische Material aus den zerstreut liegenden Reliktvorkommen zusammen, sind aus identifiziertem Basismaterial aufgebaut und so angelegt, dass der Polleneintrag durch Kultursorten eingeschränkt ist (SOPPA, 1998). Für die langfristige Erhaltung der Wildformen und ihrer genetischen Variabilität und Anpassungsfähigkeit ist die generative Vermehrung unerlässlich.

Aufgabenstellung und Zielsetzung der vorgelegten Arbeit

Die gesellschaftliche Forderung nach Erhaltung und Schutz der Artenvielfalt hat zu politischem Handeln geführt. Naturwissenschaftliche Untersuchungen und auf deren Ergebnissen basierende Maßnahmen wurden ermöglicht.

Genbanken gehören zu den wichtigsten Institutionen, die Artenvielfalt erhalten oder wieder herstellen. Moderne biotechnologische Methoden, wie in vitro Kultur und Kryokonservierung werden bisher wenig genutzt. Kryokonservierung ist das Einfrieren in flüssigem Stickstoff (bei -196°C). Sie ist vor allem unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten eine hervorragende Möglichkeit, das Überleben vieler Genotypen zu ermöglichen. Kryokonservierung ist technisch einfach, kostengünstig und zuverlässig (SCHÄFER-MENUHR et al., 1996).

In Deutschland ist die Kryokonservierung von vegetativ zu erhaltenden Pflanzen eine bislang nur wenig genutzte Form der Langzeit-Erhaltung. In der Forschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Braunschweig existiert eine Kryo-Genbank für Kartoffeln, die seit 2003 der größten deutschen Genbank, dem Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) in Gatersleben unterstellt ist. Am IPK werden grundlegende Untersuchungen zur Kryolagerung durchgeführt. Die Arbeiten konzentrieren sich auf *Allium*, vor allem *Allium sativum*, den Knoblauch (SENULA und KELLER, 2000; KELLER, 2002).

Wie in Kap. 1.2.2. beschrieben, gibt es weltweit nur eine Genbank, die *Pyrus* mittels in vitro Kultur konserviert. In Corvallis, USA, wird in Verbindung mit in vitro Kultur auch die Methode der Kryokonservierung zur Erhaltung vegetativer Muster genutzt. Für *Sorbus* existiert weder eine in vitro- noch eine Kryo-Genbank.

Das dritte Ziel in dem „Programm zur Erhaltung forstlicher Genressourcen“ für *Pyrus pyrausta* und *Sorbus torminalis* ist die Förderung durch Produktion und Nutzung. Produktion und Nutzung von Holz kann z.B. durch plantagenmäßigen Anbau von Elite-Mehrklongemischen. Zur Herstellung von Elite-Mehrklongemischen werden Plusbäume selektiert und vegetativ vermehrt, so dass ihre genotypischen Eigenschaften erhalten bleiben.

Die Selektion kann nur am adulten Baum vorgenommen werden. Die vegetative Vermehrung adulter Bäume ist jedoch schwierig (MEIER-DINKEL, 1993). Eine Lösung des Problems wäre, von den in Betracht kommenden Bäumen Material im juvenilen Zustand zu entnehmen und so lange aufzubewahren, bis die Selektion vorgenommen werden kann, um sie dann vegetativ zu vermehren. Die Aufbewahrungszeit müsste mehrere Jahre betragen, z.B. 12 oder mehr. Die Erhaltung des juvenilen Materials wäre nur dann durchführbar, wenn sie technisch einfach, kostengünstig und zuverlässig ist.

Die Kryokonservierung ist eine Form der Erhaltung, die den genannten Anforderungen genügt und außer für Genbanken auch für züchterische Zwecke geeignet ist. Nach der Kryokonservierung erfolgt die Vermehrung des Materials mit in vitro Methoden, also vegetativ, und entspricht auch damit der oben genannten Zielsetzung.

Folgende Themenbereiche sollten untersucht werden:

- **Optimierung der in vitro Kultur von *Pyrus pyrausta* und *Sorbus torminalis* im Hinblick auf eine kommerzielle Anwendung**
- **Evaluierung der Anwendbarkeit und Praktikabilität verschiedener Kryokonservierungsmethoden für *Pyrus pyrausta***
- **Entwicklung einer Kryokonservierungsmethode für *Sorbus torminalis***

Als Ausgangsmaterial für die Kryokonservierung dienten **Winterknospen** und **in vitro Sprosskulturen**. Die erfolgreiche Kryokonservierung von *Sorbus torminalis* wird erstmalig beschrieben.

Es wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Dormanz der Winterknospen einerseits die Kryokonservierbarkeit begünstigt, andererseits die in vitro Kultivierbarkeit beeinträchtigt. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche **Erntezeitpunkte der Reiser** sowie der **Einfluss der Lagerung der Reiser** geprüft.

Als Kriterium für erfolgreiches Einfrieren wurden **Vitalitätstests** auf ihre Aussagefähigkeit geprüft.

Voraussetzung für die Kryokonservierung ist ein zuverlässiges in vitro Kultur-Protokoll. Vorhandene in vitro Methoden wurden mit bereits vorhandenen Sprosskulturen optimiert und standardisiert. Dies ermöglichte den Vergleich der **in vitro Kulturen ohne und nach Kryokonservierung (sine und post Kryo)**. Die Methode des Einfrierens von Winterknospen erwies sich bei beiden Baumarten als so vielversprechend, dass sie auf eine dritte Baumart, die Vogelkirsche (*Prunus avium*), modellhaft angewendet wurde. *Prunus avium* war darüber hinaus nicht Gegenstand der Untersuchungen.

Die Arbeiten wurden an der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt, Abteilung C Waldgenressourcen (NFV-C) in Staufenberg-Escherode, Landkreis Göttingen, durchgeführt. Nur das dort vorhandene Pflanzenmaterial und die dort vorhandenen technischen Einrichtungen wurden verwendet.

Das Ziel dieser Arbeit ist, die Generhaltung, Produktion und Nutzung von *Pyrus pyraeaster* und *Sorbus torminalis* in der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt in Escherode um die bisher nicht angewandte Methode der Kryokonservierung zu erweitern. Sie könnte andere Institutionen in Deutschland und anderen Ländern ermutigen, Kryo-Genbanken für bedrohte heimische Baumarten aufzubauen und so für die Zukunft die Artenvielfalt der Wälder zu sichern.

1.2. Stand der Wissenschaft

1.2.1. In vitro Kultur

Pyrus pyraeaster und *Sorbus torminalis* gehören zu den Baumarten, denen sich in vitro Kultivateure, sei es in Forschungs- oder kommerziellen Labors, erst relativ spät zuwandten. Noch in dem 1987 erschienen Referenz-Handbuch zur Vermehrung holziger Pflanzen (DIRR und HEUSER, 1987) ist für die 18 erwähnten Arten der Gattung *Sorbus* diese Vermehrungsmethode nicht genannt. Von den 11 genannten *Pyrus*-Arten wird nur für *P. calleryana*, *P. communis* und *P. pyrifolia* die Möglichkeit der Gewebekultur aufgeführt.

Pyrus pyraeaster

Die ersten erfolgreichen in vitro Spross-Vermehrungen von *Pyrus*-Arten wurden 1979 veröffentlicht (CHENG, 1979; LANE, 1979). Eine ausführliche Beschreibung der Untersuchungen der darauffolgenden fünf Jahre findet sich bei SINGHA (1986), der außer den Sprosskulturen auch die Embryo-, Antheren-, Kallus-, Blüten- und Fruchtgewebekultur abhandelt. CHEVREAU et al. (1992) haben dies für die Zeit bis 1992 fortgesetzt. Diese und

die Mehrzahl der seither erschienenen Arbeiten wurde jedoch mit Kultursorten, bzw. Unterlagen oder anderen *Pyrus*-Wildarten durchgeführt.

Vier neuere Arbeiten befassen sich mit der hier relevanten Art *Pyrus pyraster*. An zwei als *Pyrus communis pyraster* bezeichneten Pflanzen wurden von LIBERALI und DAMIANO (1997) folgende Untersuchungen durchgeführt: Auswirkung des Zeitpunktes der Explantatentnahme, der Salz-Zusammensetzung des Nährmediums in der Vermehrungsphase und der Auxin-Komposition, sowie der Phloroglucinol-Zugabe im Bewurzelungsmedium. Die gleichen Autoren in einer erweiterten Arbeitsgruppe (DAMIANO et al., 2000) prüften auch die Möglichkeit der Regeneration von Adventivsprossen aus Blattscheiben. In der anschließenden Vermehrungsphase wandten sie ein temporäres Immersions-System (TIS) an, das auf dem Wechsel von kompletter Übersichtung der proliferierenden Sprosskulturen mit Flüssigmedium gefolgt von einer Trockenperiode beruht. Ziel dieser Arbeiten war allerdings weniger die Optimierung der Vermehrung als vielmehr die Entwicklung eines Systems, das für Transformationsexperimente mit anschließender schneller Vermehrung geeignet sein sollte. Die Vermehrungsraten und die Bewurzelung wurden durch das TIS im Vergleich zum festen Medium bei diesen zwei untersuchten Klonen verbessert. Allerdings wurden zur Bewurzelung keine Zahlen angegeben. Die Überführung und Abhärtung ex vitro wurde nicht erwähnt.

GEBHARDT et al. (1996) untersuchten 16 unterschiedliche Medien auf ihre Eignung für die Etablierung und die Vermehrung. Sie verwendeten sowohl verschiedene Salz-Zusammensetzungen als auch Phytohormon-Kombinationen und -Konzentrationen. Von deren Einfluss auf Bewurzelung und Abhärtung nach dem Pikieren wurde berichtet.

In Fortsetzung dieser Arbeiten nannten GEBHARDT und MEIER-DINKEL (1998) Sprossvermehrungskoeffizienten zwischen 2,2 und 3,4 pro Monat auf cytokinin- und gibberellinsäurehaltigen Medien. Die Bewurzelung in einem Torf-Sandgemisch unter Hochdrucknebel lag klonabhängig bei mehr als 60 %.

Sorbus torminalis

Über die in vitro Vermehrung von *Sorbus*-Arten liegen nur wenige Veröffentlichungen vor. In dem sehr umfangreichen Werk von BAJAJ (1986 - 2001) und TOWILL and BAJAJ (2002) über Biotechnologie in Landwirtschaft und Forstwirtschaft wird die Gattung *Sorbus* nicht erwähnt.

Es existieren jedoch Veröffentlichungen über *S. domestica*, *S. aucuparia* und *S. rotundifolia*, sowie eine über *Sorbus torminalis*. CHALUPA (1983, 1987) vermehrte *Sorbus torminalis* und *Sorbus aucuparia* auf Medien mit niedrigem BAP-Gehalt (0,6 bis 1,0 mg/l), wobei die Zugabe von IBA (0,05 bis 0,1 mg/l) förderlich war. Bei den angegebenen Vermehrungskoeffizienten von 3 bis 15 pro Subkultur bleibt unklar, ob diese für beide Baumarten gelten. An anderer Stelle erwähnt er ohne nähere Erläuterung, dass *Sorbus aucuparia* eine höhere Vermehrung aufwies als *Sorbus torminalis*. Für die Bewurzelung wurden GD- und WPM-Medien in halber Stärke mit Zusatz von 0,3 mg/l IBA und 0,3 mg/l NAA eingesetzt, die bei den meisten Sprossen zur Bewurzelung führten.

JAMBOR-BENCZUR et al. (1996) haben den Einfluss verschiedener Phytohormone und Kohlenhydratquellen auf die Vermehrung einer Pflanze von *Sorbus rotundifolia* untersucht. Als beste Kombination erwiesen sich 0,75 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA3 bei 15 bis

20 g/l Saccharose oder Glucose im Medium. Die Autoren betonen, dass die üblicherweise verwendete Zucker-Konzentration von 30 g/l die Sprossbildung erheblich beeinträchtigt hat.

Eine Vermehrung über den Weg der axillären Sprossbildung bei *Sorbus domestica* gelang ARILLAGA et al. (1991), die sowohl Explantate aus Sämlingen als auch aus adulten Bäumen verwendeten. Später ergänzten sie ihre Arbeit mit den Untersuchungen zur Sprossregeneration aus Hypokotyl-Explantaten. Die Organogenese nach einer Kallusphase wurde hauptsächlich durch die Auxin-Art beeinflusst, wobei NAA Wurzelbildung auslöste und IAA in Gegenwart von BA die Adventivsprossbildung förderte. Die Effekte wurden durch ein Nitrat : Ammonium – Verhältnis von 2:1 bis 4:1 verstärkt. In der besten Variante wurde bei 44% der Explantate Sprossbildung induziert (ARILLAGA and SEGURA, 1992).

Untersuchungen über die Möglichkeiten, die Bewurzelung und Abhärtung von *Sorbus domestica* zu beeinflussen, wurden von FRANCK et al. (1998) durchgeführt. Sie prüften verschiedene Auxine, sowie eine zweistufige Bewurzelungsphase. Diese bestand aus einer Woche Kultur auf IBA-haltigem Medium mit 3 mg IBA/l, der eine dreiwöchige Kultur auf hormonfreiem Medium, bzw. in einer Mischung von Vermiculit und Gelrite, folgte. Die Ergebnisse wurden nicht aufgeführt.

Sämlinge von *Sorbus domestica* waren das Ausgangsmaterial in den Untersuchungen von MEIER-DINKEL (1998). Die Etablierung wurde, die Verwendung des „richtigen“ Mediums vorausgesetzt, als unproblematisch eingestuft. Die Vermehrungskoeffizienten über mehrere Subkulturen lagen gemittelt für sieben Klone je nach Medium zwischen 2,3 und 4,4. Die Bewurzelung war stärker vom Genotyp abhängig (von 22% bis 68%) als von den verwendeten Medien (von 39% bis 43%).

Damit ist der Kenntnisstand über die in vitro Vermehrung von *Sorbus*-Arten gering. Es war für das Zustandekommen dieser Arbeit sehr hilfreich, dass im Labor der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt, wo die praktischen Arbeiten durchgeführt wurden, bereits etablierte in vitro Kulturen von *Sorbus torminalis* und somit auch erste Erfahrungen vorhanden waren.

1.2.2. Kryokonservierung

Bemerkungen zur Entwicklung der Kryokonservierung

Unter Kryokonservierung wird generell die Aufbewahrung von lebendem Material bei ultratiefen Temperaturen verstanden. Dies geschieht i. d. R. in Flüssigstickstoff (englisch liquid nitrogen = LN) bei -196°C oder in dessen Dampfphase bei ca. -150°C . Im Rahmen dieser Arbeit wird „lebendes Material“ eingengt auf Pflanzenteile, die zur vegetativen Vermehrung in vitro geeignet sind und durch Kryokonservierung die Fähigkeit zu Wachstum und Vermehrung nicht verloren haben.

Die Kryokonservierung nutzt die Ergebnisse der Forschungen zur Kryobiologie für praktische Zwecke, stellt also eine Anwendungsform dar. Der Zweig der Kryobiologie, der sich mit Pflanzen beschäftigt, erwuchs aus den Fragen nach der Natur der Frosthärte, Frosttoleranz und Frostschäden an Pflanzen. LEVITT (1956) hat in seinem Buch „The Hardiness of Plants“ die Geschichte dieses Wissenschaftszweiges sehr ausführlich geschildert. Das bereits vorhandene Wissen sollte ebenso wie bereits durchlaufene Irrwege nicht in Vergessenheit geraten. Die folgende kurze Darstellung der Meilensteine in der Geschichte der pflanzlichen Kryobiologie sind diesem Buch entnommen.

Die ersten belegten Gefrierversuche wurden bereits 1741 von DUHAMEL durchgeführt, gefolgt 1775 von HUNTER. GÖPPERT (1830) gehörte zu den ersten, die erkannten, dass ein niedriger Wassergehalt zu den Voraussetzungen für das Überleben von gefrorenen Pflanzenteilen gehört. MÜLLER-THURGAU (1880) untersuchte diverse Pflanzenteile verschiedenster Arten und fand bei Kartoffeln heraus, dass nach Unterkühlung* deutlich niedrigere Temperaturen überlebt werden als beim Gefrieren. WIEGAND (1906) beschrieb das Phänomen der Unterkühlung in der Natur an Knospen von acht Baumarten. Dass die Gefriertoleranz eines Organismus von außen beeinflusst werden kann, wies BARTETZKO (1909) durch die Anwendung verschiedener Konzentrationen von Dextrose beim Einfrieren von *Aspergillus niger* nach. ÅKERMAN (1927) betonte, dass externer Gefrierschutz nur dann wirksam ist, wenn er a) nicht toxisch und b) in der Lage ist, in das Zellinnere hineinzugelangen. Er spricht in dem Zusammenhang von „plasmolysieren“. Eine weitere entscheidende Erkenntnis war, dass die Geschwindigkeit von Einfrieren und Auftauen die Eiskristallbildung im Gewebe und damit das Auftreten von Gefrierschäden maßgeblich beeinflussen. WINKLER (1913) und HILDRETH (1926) wiesen dies an Apfelreisern nach, SCHWARTZE (1937) an Himbeeren. Das Absterben des Gewebes erfolgt im Verlauf schnellen Gefrierens bevor der Gefrierpunkt erreicht ist. Schnelles Auftauen kann die Gefrierschäden beträchtlich erhöhen, wie HILDRETH (1926) zeigte.

***Definition „Unterkühlung“** (BROCKHAUS, 1996): Abkühlung eines Stoffs unter die Temperatur eines für ihn charakteristischen Umwandlungspunkts, ohne dass eine Änderung des Aggregatzustands oder der vorliegenden Modifikation erfolgt. Ein unterkühlter Stoff befindet sich in einem instabilen Zustand im Gebiet einer anderen Phase. Viele Flüssigkeiten ... lassen sich, wenn sie sehr rein sind und nicht erschüttert werden, durch langsames Abkühlen bis tief unter dem Schmelzpunkt flüssig halten (z.B. Wasser bis unterhalb -70°C). Plötzliches Erschüttern oder Einbringen von Kristallisationskeimen führt schlagartig zum Erstarren, wobei die dabei freigesetzte Schmelzwärme das Gemisch bis zur Schmelztemperatur erwärmt.

Ein anderer Forschungskomplex widmete sich den Temperaturen in der Pflanze im Verlauf des Gefrierens. Die Verschiedenheit der Gefrierkurven bei den verschiedenen Pflanzen, das Auftreten der Exotherme und teilweise der doppelten Gefrierpunkte ebenso wie die

Unterschiede zwischen lebendem und totem Gewebe waren nicht einfach zu erklären und führten zu verschiedenen Hypothesen. Die heute anerkannte Erklärung der Vorgänge beruht zu einem wesentlichen Teil auf den Studien von LUYET und GALOS (1940). Danach sinkt beim Gefrieren die Temperatur im Pflanzengewebe zunächst relativ schnell und kontinuierlich bis zum variablen niedrigsten Unterkühlungspunkt, welcher unter dem Gefrierpunkt der Pflanze liegt. Diesem folgt ein Temperaturanstieg, die sogenannte Exotherme, auf das erste variable Maximum, das dem Gefrierpunkt des Gewebes entspricht und den Beginn der Eisbildung anzeigt. Bei sehr niedriger Kühlrate bleibt die Temperatur auf einem Plateau und sinkt danach langsam kontinuierlich ab. Ein zweiter Gefrierpunkt tritt bei stark dehydriertem Gewebe nicht mehr auf.

Das intra- und extrazelluläre Wachstum der Eiskristalle wurde bereits in der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts detailliert unter dem Mikroskop studiert und in Zeichnungen dokumentiert (GÖPPERT, 1830). Dabei wurde intrazelluläre Eisbildung in der Natur so gut wie gar nicht beobachtet, sondern nur bei künstlich erzeugtem sehr schnellem Gefrieren, z.B. durch starkes Unterkühlen und anschließendes Auslösen von oder Warten auf Eisbildung. Hier beobachtete MORREN (1838) intrazelluläres Eis bei Apfel. Extrazelluläres Eis verursacht nicht notwendigerweise Schäden, wie SIMINOVITCH und SCARTH (1938) berichteten. Aber intrazelluläres Eis führt so gut wie immer zum Zelltod, wie in verschiedenen Studien zwischen 1838 und 1938 regelmäßig beobachtet wurde, es sei denn, dass unter künstlichen Bedingungen die Gefrierate so hoch ist, dass sich nur extrem kleine, unter dem Lichtmikroskop nicht erkennbare Eiskristalle bilden.

Diese kurze Zusammenfassung der Erkenntnisse über die physikalisch-chemischen Faktoren, die beim Gefrieren das Überleben der Pflanzen beeinflussen, zeigt bereits die wichtigsten Punkte auf, die für die Kryokonservierung bekannt sein müssen. Denn hier müssen die Bedingungen so gestaltet werden, dass Tiefsttemperatur-Toleranz erzielt wird. Zu den Grundlagen der Kryokonservierung gehören daher die Faktoren:

- niedriger Wassergehalt,
- Unterkühlung,
- externe Frostschutzmittel,
- Gefrier- und Auftaurate,
- Gefrierkurven.

Alle Faktoren müssen so kombiniert werden, dass keine schädigende intra- und extrazelluläre Eiskristallbildung auftritt.

Um zu diesem Ziel zu gelangen, sind bisher für die Kryokonservierung von vegetativ vermehrbarem Pflanzenmaterial, wie es am Anfang dieses Kapitels definiert wurde, folgende Methoden entwickelt worden:

- Trocknen des Materials in Luft, z.B. im Luftstrom einer Steril-Werkbank oder über Silica-Gel.
- Trocknen durch langsames Kühlen oder Gefrieren mit einer Kühlrate von 0,5 bis 2°C pro Minute in einem computergesteuerten Einfriergerät. Bei diesem Prozess wird Eis zunächst im extra-zellulären Raum des Pflanzengewebes bildet. Die noch nicht gefrorenen Lösung wird konzentrierter und somit hypertonisch für die Zelle. Um das osmotische Equilibrium wieder herzustellen, tritt Wasser aus dem Protoplasten aus. Somit wird die Zelle dehydriert.
- Trocknen durch osmotische Dehydrierung. Hochkonzentrierte Zuckerlösungen entziehen den Zellen Wasser.
- Als externe Frostschutzmittel werden am häufigsten Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glycerol eingesetzt. DMSO hat den Vorteil, extrem schnell in die Zellen einzudringen,

aber den Nachteil, auch in niedriger Konzentration cytotoxisch zu wirken. Bei empfindlichen Kulturen wird daher Glycerol eingesetzt oder Aminosäuren, z. B. Prolin.

- Adaption des Metabolismus – Abhärtung. Dadurch kann es zu einem erheblichen Anstieg von z. B. Proteinen, Glycerol, Prolin und anderen Stoffen in den Zellen kommen, die zusammen zu einem Anstieg des osmotischen Wertes der Zellflüssigkeit führen. Dies erniedrigt den Gefrierpunkt und ermöglicht Unterkühlung.
- Vitrifizierung ermöglicht die Vermeidung von Eiskristallbildung ohne extremen Wasserentzug. Vitrifizierung ist physikalisch definiert als die Transformation einer wässrigen Lösung von der flüssigen zu einer festen, glasartigen, amorphen Phase ohne Kristallbildung. Der Wassergehalt des Gewebes darf 20 bis 30% nicht übersteigen, und es muss extrem schnell gefrieren, z.B. indem es direkt in Flüssigstickstoff verbracht wird.
- Als „Mittel zum Zweck“ ist die Einbettung in Alginatkugeln, wie sie für die Versuche zur Herstellung synthetischer Samen entwickelt wurde, anzusehen, die für sich die Explantate nur vor mechanischen Schäden schützt. Erst in Kombination mit einer oder mehreren der genannten Methoden stellt sie eine heute sehr häufig eingesetzte Anwendung in der Kryokonservierung dar.

Die aufgeführten Methoden sind sehr ausführlich in folgenden Schriften beschrieben: KARTHA, 1985; BENSON, 1994; REED and CHANG, 1997; ENGELMANN, 1998.

Kryokonservierung von *Pyrus*

Zur Kryokonservierung verschiedener *Pyrus*-Arten liegen 16 Veröffentlichungen vor, beginnend 1978. Sie kommen aus Japan, Frankreich und den USA, wo es große Sammlungen von *Pyrus*-Arten in Genbanken gibt. Andere Länder mit nennenswerten Sammlungen sind z.B. Belgien (820 Sorten in Gembloux), Dänemark (190 Sorten in Taastrup), Italien (365 Sorten in Florenz, 201 Sorten in Forli, 300 Sorten in Rom) und Großbritannien (484 Sorten in Brogdale). 1989 wurden in einer weltweiten Erhebung des International Board of Plant Genetic Resources (IBPGR) *Pyrus*-Sammlungen in 32 Ländern an 67 Orten festgestellt (BETTENCOURT and KONOPKA, 1989). Die größte Sammlung von *Pyrus*-Wildarten befindet sich in dem Land, in dem *Pyrus* natürlicherweise nicht vorkommt: bei der National Germplasm Collection der USA in Corvallis, Oregon. Bei der IBPGR - Umfrage war Corvallis die einzige Genbank, die angab, *Pyrus* in Form von in vitro Kulturen zu konservieren. Die bis heute einzige Kryo-Genbank für *Pyrus* befindet sich ebenfalls in Corvallis und beinhaltet über 100 Akzessionen (REED, 2001).

Die erste Veröffentlichung über eine erfolgreiche Kryokonservierung von *Pyrus* erfolgte 1978 von SAKAI und NISHIYAMA und basierte auf langjährigen Forschungen SAKAIs zur Tieftemperatur-Toleranz frostharter Baumarten (SAKAI, 1960). Sie hatten die ruhenden Knospen von Winterreisern auf -40°C vorgefroren und dann direkt in Flüssigstickstoff getaucht. Die mikroskopische Evaluierung ergab bei allen vier geprüften Sorten starke Schäden des Xylems und mittlere oder keine Schäden der Cortex. Die Sprosse überlebten je nach Sorte zu 0% bis 100% der 9 bis 15 Stück je Variante, wobei nicht angegeben wurde, in welcher Form die Prüfung auf Überleben stattfand. Die in demselben Artikel beschriebenen Untersuchungen an der Apfelsorte 'McIntosh Red' wurden mittels Pfropfung auf Sämlingsunterlagen geprüft. Da der Begriff „in vitro Kultur“ oder ähnliches in diesem Artikel nicht erwähnt wird, ist davon auszugehen, dass hier keine in vitro Methoden angewendet wurden.

Die einzige andere Untersuchung, in der über Versuche mit Pfropfungen berichtet wird, wobei es sich um Mikropfropfungen *in vitro* handelte, war die von SUZUKI et al. (1997). Hier wurde, wie bei SAKAI und NISHIYAMA (1978) ausgehend von ruhenden Winterknospen, eine gezielte Dehydrierung der Knospen auf 41% Wassergehalt vorgenommen und dann in 5°C-Schritten, ein Schritt pro Tag, bis -30°C vorgekühlt. Das Auftauen erfolgte langsam bei 0°C in Luft. Die Anwachsrate waren sortenabhängig und betrugen bei den 12 getesteten Birnensorten bis zu 100%. Auch OKA et al. (1991) haben das schrittweise Vorgefrieren von ruhenden Winterknospen untersucht und dabei die Geschwindigkeit des Vorgefrierens ebenso wie die des Auftauens studiert. Die angegebenen Überlebensraten waren am höchsten bei folgender Behandlung: Vorkühlen in Gefrierkammern bei 0, -5, -10, -20, -30°C für einen Tag bei jeder Temperaturstufe, Eintauchen in LN, langsames Auftauen in Luft bei 0°C. Als Überlebensraten gaben OKA et al. Werte zwischen 60% und 80% an. Anders als SAKAI und NISHIYAMA (1978) und SUZUKI et al. (1997) prüften sie auch die Fähigkeit zur Sprossregeneration *in vitro*. Im Gegensatz zu den hohen Überlebensraten waren die Sprossregenerationsraten gering: Sie lagen zwischen 3% und 8%. OKA et al. wiesen in diesem Zusammenhang auf die ebenfalls niedrige Sprossbildungsrate ihrer ungefrorenen Kontrollen hin (ohne Zahlenangabe) und betonten die Notwendigkeit, zunächst eine funktionierende *in vitro* Methode zu erarbeiten. Es waren vor allem diese Arbeiten von OKA et al. und SUZUKI et al. (1997), an die die hier vorgelegten eigenen Untersuchungen mit ruhenden Winterknospen anknüpften. Weitere Publikationen über die Nutzung des natürlichen Frostschatzes ruhender Winterknospen bei *Pyrus pyrausta* für die Kryokonservierung und anschließende *in vitro* Kultur sind nicht bekannt.

In der Tabelle 3 werden die jeweils ersten Publikationen der unterschiedlichen Kryokonservierungsmethoden bei *Pyrus* aufgeführt. Daraus ist zu entnehmen, dass ruhende Knospen bereits 1985 von MORIGUCHI et al. verwendet wurden. Allerdings wurden vor dem Einfrieren die Apices präpariert und mit Gefrierschutzmitteln behandelt. Dies war ebenso der Fall bei MI und SANADA (1994).

Die erste Anwendung der aus der Entwicklungsarbeit für synthetische Samen übernommenen Einkapselung von Apices in Alginatkugeln für die Kryokonservierung wurde von DEREUDDRE et al. (1990) an der Birnensorte 'Beurre Hardy' erprobt. Sie wurde variiert und weiterentwickelt (SCOTTEZ et al., 1991; NIINO and SAKAI, 1992; NIINO, 1993; DEREUDDRE et al., 1994). In allen Anwendungen wurden *in vitro* Sprosskulturen nach einer Abhärtungsphase eingekapselt und dann einer mehrstufigen Dehydrierung unterzogen. Diese bestand aus osmotischer Dehydrierung mit Saccharose, z.T. in mehreren Schritten, und anschließendem physikalischen Wasserentzug im Luftstrom oder über Silica-Gel. Danach wurden die Alginatkugeln sehr schnell gefroren durch direktes Eintauchen in LN und langsam aufgetaut in Luft bei Raumtemperatur. Die *in vitro* Sprossbildungsrate variierten je nach Birnensorte und Methode zwischen 40% und 80%.

Tab. 3: Erst-Autoren verschiedener Methoden der Kryokonservierung von *Pyrus*

Art / Sorte	Ausgangsmaterial	Vorbehandlung	Gefriermethode	Referenz
<i>P. serotina</i> cv. Kosui	Apices von ruhenden vegetativen Knospen	90 min. in DMSO, Glucose oder Sorbitol bei 0°C	Vorkühlen auf -40° bis -70°C	Moriguchi et al., 1985
<i>P. communis</i> cv. Beurre Hardy	axilläre in vitro Apices nach 8 Wochen Abhärtung bei 0°C	Einkapselung in Alginat und Trocknung	direktes Eintauchen in LN	Dereuddre et al., 1990
<i>P. serotina</i> cv. Senryo	vegetative Knospen		schrittweises Vorkühlen bis -40°C	Oka et al., 1991
8 Sorten von <i>P. communis</i>	axilläre in vitro Apices nach 3 Wochen Abhärtung bei 5°C	Vitrifizierung mit PVS2-Lösung	direktes Eintauchen in LN	Niino and Sakai, 1992
<i>P. cordata</i>	in vitro Apices nach 2 Wochen Abhärtung bei 3°C	3 Wochen auf ABA oder Saccharose, 2 Tage auf DMSO, 1 Std. in PGD (Erläuterung s. u.)	langsames Vorkühlen mit 0,1°C/min bis -40°C	Reed, 1990; Chang and Reed, 2001

Die Einkapselungs-Dehydrierungsmethode wurde in der weltweit größten *Pyrus*-Genbank in Corvallis, Oregon, USA, nicht angewendet. Für die seit 1987 im Aufbau befindliche Kryogenbank übernahm REED die Methode des langsamen Einfrierens (Kühlraten zwischen 0,1 und 0,8°C/min bis -40°C) von Sprossspitzen von SUZUKI et al. (1987) und entwickelte sie weiter in Kombination mit vorausgegangener Abhärtung. Sie publizierte sie zeitgleich mit DEREUDDRE et al. im Jahr 1990. Beide inkubierten, wie es MORIGUCHI et al. (1985; siehe Tabelle 3) mit Apices von ruhenden Winterknospen getan hatten, das Material in - allerdings unterschiedlichen - Gefrierschutzlösungen und führten ein schnelles Auftauen im Wasserbad bei 40°C durch. Die Sprossbildungsraten lagen sorten- und methodenabhängig zwischen 0% und 95%.

REED hat seither viel über den Einfluss der Vorkulturbedingungen auf die Kryo-Toleranz bei Birnen und anderen holzigen Gewächsen veröffentlicht (REED, 1993; REED and YU, 1995; REED and CHANG, 1997; REED et al., 1998; CHANG and REED, 1999; CHANG and REED, 2000; CHANG and REED, 2001). Entscheidende Punkte waren die Abstimmung der Abhärtungstemperaturen und Abhärtungsdauer auf die Pflanzenart, bzw. Sorte, der Einfluss von Abscisinsäure (ABA) während der Abhärtungsphase und die Kombination von Abhärtung, ABA und der osmotischen Konditionierung mit Saccharose. Das Vorgehen nach diesen Vorbehandlungen, die bis zu 16 Wochen dauern können, hat REED folgendermaßen standardisiert:

Zwei Tage Inkubation auf DMSO-haltigem Medium (5%), eine Stunde Inkubation in tropfenweise zugegebener PGD-Lösung (einer Mischung von je 10% (w/w) Polyethylenglycol (MW 8000), Glukose und Dimethylsulfoxid (DMSO) in Flüssigmedium) bei 0°C, langsames Kühlen mit 0,1°C/min bis -40°C in einem programmierbaren Gefriergerät, danach Eintauchen in LN. Auftauen im 45°C-Wasserbad für 1 Minute, danach im 23°C-Wasserbad für 2 Minuten. Spülen der Apices in Flüssigmedium, platzieren auf Vermehrungsmedium.

Bei allen Arbeiten setzt REED eine größere Anzahl Genotypen, häufig auch Arten, ein, so dass die Ergebnisse meistens auf einem breiten genetischen Spektrum beruhen. Insgesamt

wurden über 100 Genotypen einem Screening unterzogen, von denen 61% Kryo-Toleranz aufwiesen. Die durchschnittlichen Sprossbildungsraten lagen über 40%.

Auch die Vitrifizierung wurde erfolgreich für die Kryokonservierung von *Pyrus* genutzt (siehe Tabelle 3). NIINO und SAKAI (1992) hatten sie kombiniert mit vorausgegangener Abhärtung (3 Wochen bei 5°C) und Vorkultur mit 0,7 M Saccharose für 1 Tag bei 5°C. Die Regenerationsraten der 8 getesteten Birnensorten betrugen bis zu 80%. Diese Methode wurde ebenfalls von REED et al. (1998) eingesetzt. Mit 43% positiv reagierenden Genotypen war die Methode jedoch nicht so vielversprechend wie die oben beschriebene Methode des langsamen Einfrierens. Es liegen jedoch keine Veröffentlichungen über weitere Versuche zum Einfluss der Vorkultur oder andere Modifizierungen der Vitrifizierungsmethode im Zusammenhang mit *Pyrus* vor.

Kryokonservierung von *Sorbus*

Zur Kryokonservierung von *Sorbus* liegen keine Veröffentlichungen vor.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial wurde, sofern nicht anders angegeben, von der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt, Abteilung C Waldgenressourcen (NFV-C) in Escherode, zur Verfügung gestellt.

2.1.1. *Pyrus pyraeaster*

Winterknospen

Als Explantatspender für Arbeiten mit ruhenden Winterknospen dienten selektierte, qualitativ hochwertige Einzelbäume aus 3 Nachkommenschaftsprüfungen (NKP) an folgenden Standorten:

1. Niedersächsisches Forstamt Oldendorf, Revierförsterei Dobbelstein, Abteilung 1067, Aktenzeichen 21.218.01. NKP mit 4 Halbgeschwisterfamilien aus Einzelbaumabsaaten von Plusbäumen aus Fürstenberg. 1987 ausgesät und 1989 gepflanzt. Es wurden 15 Bäume aus 4 Halbgeschwisterfamilien mit den Bezeichnungen 1067-1 bis 1067-15 verwendet.
2. Niedersächsisches Forstamt Grohnde, Revierförsterei Ottenstein Süd, Abteilung 320, Aktenzeichen 21.218.06. NKP mit 10 Halbgeschwisterfamilien aus Einzelbaumabsaaten von Plusbäumen aus Fürstenberg, Trittau, Nonnenholz und der Schweiz. 1987 ausgesät und im Frühjahr 1989 gepflanzt. Es wurden 12 Bäume aus sieben Familien mit den Bezeichnungen 320-1 bis 320-12 verwendet.
3. Niedersächsisches Forstamt Bovenden, Revierförsterei Lengler, Abteilung 95, Aktenzeichen 21.218.08. NKP mit 6 Halbgeschwisterfamilien aus Einzelbaumabsaaten von Plusbäumen aus Arenberg, Göttingen und Lappwald. 1989 ausgesät und 1992 gepflanzt. Es wurden 14 Bäume aus 5 Familien mit den Bezeichnungen 95-1 bis 95-14 verwendet.

Für die vorliegende Arbeit wurden die jeweils besten Einzelbäume aus den besten Familien ermittelt, wobei die ausschlaggebenden Kriterien die Wuchsleistung und die Stamm- und Kronenform waren. Es wurden einjährige Triebe mit ruhenden Winterknospen geerntet, sofort gebündelt, in gasdurchlässige Plastiktüten verpackt und bis zur Verwendung im Kühlraum bei +5°C eingelagert. Die beernteten Bäume wurden mit Farbbändern markiert, so dass bei Wiederholungen sichergestellt war, dass vom selben Baum geerntet wurde.

Ein weiterer Standort mit Bäumen, die als Explantatspender verwendet wurden, war das Wildbirnenklonarchiv mit dem Standort Niedersächsisches Forstamt Escherode, Revierförsterei Pfaffenstrauch, Abt. 70, Aktenzeichen 11.203.06. Es war als Randbepflanzung der Bergahorn-Pfropflingssamenplantage „Bergland über 400 m“ 1993 gepflanzt worden. Bei den Wildbirnen-Pfropflingen handelte es sich um Material von Originalbäumen aus norddeutschen Reliktvorkommen.

Eine Aufstellung der verwendeten Klonnummern und deren Zuordnung zeigt Tabelle 4.

Grüne Knospen von Pfropflingen

Für die Versuche zur Etablierung von grünen Knospen (im Gegensatz zu ruhenden Winterknospen) wurden Pfropflinge aus dem Freiland in Kalenderwoche (KW) 13 zum

Antreiben in ein Folien-Gewächshaus gestellt. Die frischen Austriebe wurden nach 2 Wochen (in KW 15) und 14 Wochen (in KW 27) geerntet. Es wurden sowohl Sprossspitzen als auch ca. ½ cm lange Nodienstücke mit Achselknospen verwendet. Bei den Pfropflingen handelte es sich um Material von Originalbäumen aus norddeutschen Reliktvorkommen, aufgestellt in Containern (Tabelle 4).

Tab. 4 *Pyrus pyraeaster*-Pfropflinge von Originalbäumen aus norddeutschen Reliktvorkommen

NFA = Niedersächsisches Forstamt

SAFA = Sachsen-Anhaltinisches Forstamt

MVFA = Mecklenburg-Vorpommersches Forstamt

Wildbirnenklonarchiv, Standort Niedersächsisches Forstamt Escherode, Revierförsterei Pfaffenstrauch, Abt. 70, Aktenzeichen 11.203.06. Als Randbepflanzung der Bergahorn-Pfropflingssamenplantage „Bergland über 400 m“ 1993 gepflanzt.		
Klonnummer	Herkunft, Alter des Mutterbaums	Anzahl Pfropflinge
Bov 0-1	NFA Bovenden, Alter unbekannt	1
Gött 80-20	NFA Göttingen, 61 Jahre	1
Gött 80-21	NFA Göttingen, 61 Jahre	1
Gött 80-22	NFA Göttingen, 81 Jahre	1
HanM 408-4	NFA Münden, 50 Jahre	1
HanM 409-9	NFA Münden, 90 Jahre	2
HanM 421-12	NFA Münden, 20 Jahre	2
HanM 422-13	NFA Münden, 80 Jahre	1
HanM 422-14	NFA Münden, 50 Jahre	1
HanM 427-21	NFA Münden, Alter unbekannt	1
HanM 431-16	NFA Münden, Alter unbekannt	1
Hard 176-1	NFA Winnefeld, 80 Jahre	2
Rein 0-2	NFA Reinhausen, 70 Jahre	2
Rein 0-4	NFA Reinhausen, 20 Jahre	1
Rein 0-5	NFA Reinhausen, 25 Jahre	3
STO 59-1	NFA Stadtoldendorf, 120 Jahre	1
STO 59-2	NFA Stadtoldendorf, 70 Jahre	5

<i>Bäume im Container, gepfropft zwischen 1995 und 1998</i>		
Klonnummer	Herkunft, Alter des Mutterbaums	Anzahl Pfropflinge
AlfEi 4-6	NFA Grünenplan, 80 Jahre	1
AlfEi 10-21	NFA Grünenplan, 60 Jahre	1
Nord 7-18	NFA Nordsteimke, 30 Jahre	1
Steck 0-12	SAFA Lindau, 130 Jahre	1
Luc 0-3	MVFA Großen Luckow, 100 Jahre	1
Luc 0-5	MVFA Großen Luckow, 200 Jahre	1

In vitro Kulturen

Es wurden bestehende in vitro Kulturen der NFV-C genutzt, um rasch mit den Versuchen beginnen zu können. Es handelte sich zum Teil um Klone mit sehr guter in vitro Eignung, wie z.B. dem Klon 59-2 (Abbildung 28 im Anhang) Außerdem wurden zwei Klone von externen Stellen zur Verfügung gestellt. Ihre Charakterisierung steht in Tabelle 5.

Tab. 5 In vitro Kulturen von *Pyrus pyraeaster*

NFA = Niedersächsisches Forstamt

Rfö. = Revierförsterei

StFoA = Stadtforstamt

HLFWW = Hessische Landesanstalt für Waldeinrichtung und Waldnutzung

Klonnummer	Etablierung in vitro	Herkunft, Alter des Mutterbaums	zur Verfügung gestellt von
Rein 0-5 (Kurzform: 5)	1996	NFA Reinhausen, Rfö. Groß Schneen, 25 Jahre	NFV-C
Hard 176-1 (Kurzform: 176-1)	1996	NFA Hardeggen, Rfö. Leisenrode, 80 Jahre	NFV-C
HanM 439-28 (Kurzform: 439-28)	1991	StFoA Münden, Rfö. Hedemünden, 80 Jahre	NFV-C
Sto 59-2 (Kurzform: 59-2)	1991	NFA Stadtoldendorf, Rfö. Heidbrink, 70 Jahre	NFV-C
PER 54	(nicht bekannt; vor 1998)	Istituto Sperimentale per la Frutticoltura, Ciampino, Italien, 18 Jahre	Prof. Dr. Carmine Damiano, Ciampino
B 414	(nicht bekannt; vor 1998)	Hessisches Forstamt Reichensachsen, Rfö Sontra Fort Jakobsgraben (Alter nicht bekannt)	Dr. Karl Gebhardt, HLFWW

2.1.2. *Sorbus torminalis*

Winterknospen

Als Explantatspender für Arbeiten mit ruhenden Winterknospen dienten selektierte, qualitativ hochwertige Einzelbäume aus einer Nachkommenschaftsprüfung (NKP). Diese bestand aus 69 Halbgeschwisterfamilien aus Einzelbaumabsaaten von Plusbäumen der 9 Herkünfte Göttingen, Lutter, Sailershausen, Schweinfurt, Würzburg, Bar-le-Luc / Frankreich, Luxemburg, Österreich und Tschechoslowakei. Diese waren 1976 ausgesät und im Herbst 1979 auf drei verschiedenen Standorten ausgepflanzt worden. Einer dieser Standorte war Freiburg und stand auf Grund der weiten Entfernung nicht zur Verfügung. Die beiden anderen Standorte waren:

1. NFA Lutter, Rfö. Haarwald, Abt. 77, Aktenzeichen 22.214.01. Für die vorliegende Arbeit wurden aus zehn Halbgeschwisterfamilien 20 Einzelbäume selektiert. Sie erhielten die Klonnummern 1077-1 bis 1077-20.
2. NFA Grohnde, Rfö. Wilmeröderberg, Abt. 126, Aktenzeichen 22.214.02. Es wurden 3 Einzelbäume selektiert. Sie erhielten die Klonnummern 126-1 bis 126-3.

In vitro Kulturen

Es wurden bestehende in vitro Kulturen der NFV-C genutzt, um, wie bei *Pyrus pyrauster*, rasch mit den Versuchen beginnen zu können. Diese sind in der folgenden Tabelle 6 charakterisiert.

Tab. 6 In vitro Kulturen von *Sorbus torminalis*

Abkürzung: NFA = Niedersächsisches Forstamt

Klonnummer	Etablierung in vitro	Herkunft, Alter des Mutterbaums
85, 98, 121, 163	1992	Saatgut zweier frei abgeblühter Plusbäume aus Thüringen, Revier Oberndorf, Oberförsterei Arnstadt, Abt. 4504 b ² , Naturschutzgebiet „Der Hain“.
18/2	1992	Stockausschlag von einem der oben genannten Bäume.
76, 146, 283 243	1995 1996	vierjährige Sämlinge aus der Lohnanzucht des NFA Liebenburg bei Firma Rathe

2.1.3. *Prunus avium*

Winterknospen

Als Explantatspender wurden drei Bäume aus drei Familien aus der Einzelbaumnachkommenschaftsprüfung Gatersleben ausgewählt, die als Pfropflinge von 1991 im Kamp der NFV-C, Fläche 16, standen. Die Bäume sind wie folgt beschrieben:

Baum Nr. 247-4 Familie Heteborn 16. Ursprungsort des Auslesebaumes ist Revier Heteborn, Forstamt Ballenstedt.

Baum Nr. 247-24 Familie Heteborn 3. Ursprungsort des Auslesebaumes wie 247-4.

Baum Nr. 247-28 Familie Altenweddigen IX/48. Herkunftsort des Zuchtbaumes: Altenweddigen bei Magdeburg, Sämlingsplantage holländischer Herkunft eines Saatzuchtbetriebes.

2.1.4. Reisererntetermin und Reiserlagerung

In zwei aufeinander folgenden Wintern (zwei Serien) wurde der Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung untersucht. Modellhaft wurde in Serie 1 *Prunus avium* mitbearbeitet.

Die Reiser wurden in monatlichen Abständen (jeweils zur Monatsmitte) von jeweils denselben Bäumen geerntet. In Serie 1 (Winter 1999/2000) erfolgte dies von Dezember bis März. Auf Grund der Ergebnisse der 1. Serie wurde in der 2. Serie (Winter 2000/2001) von November bis März geerntet.

Um Variationen, die auf die Position der Zweige am Baum zurückzuführen sein könnten, zu vermeiden, hätten die Reiser alle aus demselben Bereich der Krone geschnitten werden müssen. Die Baumkronen waren allerdings dafür zu klein. Stattdessen wurden an jedem Termin Reiser aus verschiedenen Bereichen der Krone entnommen und anschließend gemischt auf die verschiedenen Behandlungsvarianten verteilt.

Alle Reiser jedes Erntetermins wurden für die in vitro Kultur präpariert, vorher jedoch 4 Behandlungsvarianten unterzogen, von denen jede mit 20 Knospen durchgeführt wurde: Ein Viertel wurde sofort präpariert. Ein Viertel wurde sofort der Kryokonservierung zugeführt. Zwei Viertel wurden für zwei Monate bei +5°C gelagert. Nach der Lagerung wurde das eine Viertel direkt präpariert und das letzte Viertel kryokonserviert. Es waren daher in diesem Versuchsschema folgende **8 Variable** von Einfluss:

- Baumart
- Genotyp
- Erntejahr
- Erntemonat
- ohne Lagerung ohne Kryokonservierung
- ohne Lagerung mit Kryokonservierung
- mit Lagerung ohne Kryokonservierung
- mit Lagerung mit Kryokonservierung.

Es wurden folgendes Material verwendet:

Pyrus pyrausta: Drei Bäume mit den Bezeichnungen 95-1, 95-12 und 95-14 (Standort Bovenden, siehe oben, Punkt 2.1.1.).

Sorbus torminalis: Drei Bäume mit den Bezeichnungen 126-1, 126-2 und 126-3 (Standort Grohnde, siehe oben, Punkt 2.1.2.).

Prunus avium: Drei Bäume mit der Bezeichnung 247-4, 247-24 und 247-28 (Standort NFV-C, siehe oben, Punkt 2.1.3.).

2.2. Kulturgefäße

Als Kulturgefäße wurden den Explantatgrößen entsprechend entweder Glaspetrischalen (100 x 20 mm) oder 250 ml – Weckgläser (Rillengläser der Fa. Weck) mit Zellstoffringen (Paramoll, Durchmesser 260/200 mm, 2 mm stark, Fa. Mauck) zwischen Glasunterteil und Glasdeckel verwendet. Alle Gefäße wurden nach der Reinigung an der Luft getrocknet und dann in Aluminium-Büchsen verpackt im Trockensterilisator bei 200°C für 6 Stunden sterilisiert. Bis zur Verwendung blieben sie zum Schutz vor Verunreinigung in den Aluminium-Büchsen.

In der Vermehrungsphase fanden neben den og. Weckgläsern auch 380 ml - Honiggläser der Firma Meli, Belgien, Verwendung. Wegen ihres Kunststoffdeckels (opak) wurden sie im Autoklav sterilisiert.

Pro Kulturgefaß wurden ca. 40 ml Medium (Petrischalen), ca. 80 ml (Weckgläser), bzw. ca. 50 ml (Honiggläser) ausgegossen. Nach Einsetzen der Explantate wurden Petrischalen und Rillengläser nicht, wie häufig üblich, mit Parafilm abgedichtet. Die Deckel wurden mit zwei kurzen Klebestreifen (Tesa-film) fixiert, so dass der Gasaustausch so wenig wie möglich behindert wurde. Die Schraubdeckel der Honiggläser wurden nicht zusätzlich fixiert.

2.3. Kulturführung

2.3.1. Kulturräume

Der Standard-Kultorraum war für alle Phasen der *in vitro* Kultur gleich. Beleuchtet wurde mit Philips TLD 36W/84 Leuchtstoffröhren im 16 / 8 h Tag-Nacht-Rhythmus. Die übliche Beleuchtungsstärke lag bei $60 - 80 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Die Temperatur betrug $24^\circ / 18^\circ\text{C}$ ($\pm 1^\circ\text{C}$) im Tag-Nacht-Rhythmus. Die nicht geregelte Luftfeuchtigkeit betrug ca. 30 bis 60 % r. F., wobei die höheren Werte überwiegend im Sommer auftraten.

Außer dem Standard-Kultorraum wurden Licht-Thermostat-Schränke der Firma Rubarth eingesetzt. Die Beleuchtung erfolgte mit Osram L 36W/11 Leuchtstoffröhren und einer Beleuchtungsstärke von $9 - 13 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ in Höhe der Sprosskulturen. Die Beleuchtungsdauer und Temperatur wird bei den entsprechenden Versuchen beschrieben.

Für Zwischenlagerung und Langzeitlagerung der *in vitro* Kulturen ebenso wie für die Lagerung der Reiser vor der *in vitro* Kultur wurde der Kühlraum benutzt. Dieser war wie der Kultorraum mit Philips TLD 36W/84 Leuchtstoffröhren ausgestattet und wurde im 12 / 12 h Tag-Nacht-Rhythmus mit $0,6 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ beleuchtet. Die Temperatur betrug 5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) konstant.

2.3.2. Gewächshaus

Pikierte Pflanzen wurden standardmäßig in einem Glas-Gewächshaus, das ausschließlich für diesen Zweck genutzt wurde, unter einem Folientunnel an Substrat gewöhnt. Der Tisch war mit Filzmatten ausgelegt, die immer feucht gehalten wurden und so für eine hohe Luftfeuchtigkeit im Tunnel sorgten. Das Temperaturminimum war auf 18°C eingestellt. Darüber hinaus war die Temperatur von den Wetterbedingungen abhängig. Bei starker Sonneneinstrahlung wurden im Folientunnel trotz Schattierung bis zu 40°C erreicht. Das Bewässern der Pflanzen erfolgte von Hand. Bis zum Topfen wurde nicht gedüngt. Als Pflanzenschutzmaßnahme wurden bei Auftreten von Botrytis die Fungizide Rovral und Ronilan im Wechsel gespritzt.

2.4. Handhabung der *in vitro* Kulturen

2.4.1. Oberflächensterilisation

Prinzipiell wurde vor der Präparation der Winterknospen folgendermaßen vorgegangen:

1. Gründliches Spülen und Bürsten der Reiser unter fließendem Leitungswasser.
2. Schneiden der Reiser jeweils direkt oberhalb einer Knospe und ca. 1 cm unterhalb einer Knospe.

Die gereinigten Reiserstücke wurden in folgenden Lösungen sterilisiert:

Methode 1:

1. vergälltes Ethanol (EtOH, 70% v/v)
2. verdünntes Natriumhypochlorit (NaOCl) mit einigen Tropfen Tween 20 (Laurylsorbitan-polyethylen-glycolether)
3. steriles Leitungswasser, dreimal je 5 Minuten.

Die Dauer der Einwirkung von EtOH (zwischen 0,5 und 2 Minuten) und NaOCl (zwischen 5 und 20 Minuten) wurde variiert, sowie die Konzentration von NaOCl (zwischen 1% und 10% aktives Chlor). In einigen Versuchen wurde eine Nachbehandlung mit Ascorbinsäurelösung (100 mg/l) für 30 Minuten durchgeführt mit dem Ziel, Verbräunungen mit Hilfe dieses Antioxidationsmittels zu vermindern.

Für *Prunus avium* wurden standardmäßig folgende Zeiten und Konzentrationen eingesetzt:
1 Minute 70% EtOH, 20 Minuten 5% NaOCl

Für die Austriebe der Pflöpflinge von *Pyrus pyraister* wurde die NaOCl-Lösung 1%ig für 10 Minuten angewendet.

Methode 2 (Modifikation der Methode 1 nach GEBHARDT, persönl. Mitteilung):

1. Ascorbinsäurelösung 0,1% (unsteril; mit einigen Tropfen Tween 20) für 5 – 10 Minuten
2. NaOCl (mit einigen Tropfen Tween 20)
3. steriles Leitungswasser, zweimal für je 5 Minuten
4. EtOH (70% v/v) mit 0,1% Ascorbinsäure für 2 Minuten

Für Elsbeere wurde NaOCl 10%ig für 15 Minuten verwendet.

Für Wildbirne wurde NaOCl 1,5%ig für 10 Minuten verwendet.

Dies war der Standard für alle Versuche zum Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung.

2.4.2. Präparation der Explantate

Ausgangsmaterial: Winterknospen

Nach der Oberflächensterilisation wurden die Knospenschuppen entfernt, die **Apices** in einer Größe von ca. 2 mm keilförmig aus dem Zweig herausgeschnitten und auf Etablierungsmedien in Petrischalen gesetzt. Diese Präparation erfolgte unter einem Stereomikroskop mit 16facher Vergrößerung. Am Tag nach der Präparation wurden die Apices innerhalb derselben Petrischale umgesetzt, um sie von eventuell aus der Schnittstelle ins Medium diffundierten oxidierten Phenolen, die das weitere Wachstum behindern würden, zu entfernen. Wenn Verbräunungen im Medium sichtbar wurden, wurde eine Woche nach Präparation erneut umgesetzt. Ca. 6 Wochen nach Präparation der Apices waren häufig bereits die Blätter entfaltet und der Spross begann zu wachsen (Abb. 29 im Anhang).

Ausgangsmaterial: Grüne Knospen von Pfropflingen

Die Sprossachsen wurden in ca. $\frac{1}{2}$ cm lange **Nodienstücke** mit Achselknospen geschnitten. Die Sprossspitzen, deren größere Blätter entfernt wurden, wurden ebenfalls in einer Länge von ca. $\frac{1}{2}$ cm verwendet.

Ausgangsmaterial: in vitro Sprosskulturen

Standardmäßig wurden die **Einzelsprosse**, die aus multipler Sprossbildung an der Basis entstanden und zu Büscheln heranwuchsen, abgetrennt und als Explantate verwendet.

In einem Versuch wurde geprüft, ob das sonst bei der Vermehrung von Baumarten unübliche Zerschneiden von Einzelsprossen in **mononodiale Segmente**, die so klein sind, dass sie jeweils nur eine Axillarknospe tragen (Segmentlänge ca. 2 – 3 mm), zu höheren Vermehrungsraten führt. Durch diese Segmentierung wird der Einfluss der apikalen Dominanz aufgehoben und das Austreiben jeder einzelnen Achselknospe ermöglicht.

Für diesen Versuch wurden folgende 6 Elsbeeren-Klone der zur Verfügung gestellten in vitro Sprosskulturen verwendet: 76, 85, 146, 163, 243 und 283.

2.4.3. Nährmedien**Herstellung**

Folgende Bestandteile für die in vitro Kulturmedien wurden als Stammlösungen mit entsprechend hoher Konzentration angesetzt und in Aliquots verwendet: Makro- und Mikroelemente, Eisen, organische Zusatzstoffe (Vitamine), Auxine, Cytokinine und Gibberellinsäure. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei + 8°C.

Tab. 7 Zusammensetzung der Basalmedien: Nährsalze, Vitamine und Stickstoff-Quellen.

Mengenangaben in mg/l.

MS nach MURASHIGE und SKOOG (1962); WPM nach LLOYD und McCOWN (1981); Jacquot nach JACQUIOT (1959).

Substanz	Chemische Formel	MS	MS 1/3	WPM	Jacquot
<i>Nährsalze</i>					
Ammoniumnitrat	NH ₄ NO ₃	1650	550	400	1650
Borsäure	H ₃ BO ₃	6,2	2,1	6,2	6,2
Calciumchlorid	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	147	96	440
Calciumnitrat	Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O			556	
Kaliumjodid	KJ	0,83	0,28		0,83
Kaliumnitrat	KNO ₃	1900	633		1900
Kaliumphosphat	KH ₂ PO ₄	170	56,7	170	170
Kaliumsulfat	K ₂ SO ₄			990	
Kobaltchlorid	CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	0,008		0,025
Kupfersulfat	CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	0,008	0,025	0,025
Magnesiumsulfat	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370	123,3	370	370
Mangansulfat	MnSO ₄ · 4 H ₂ O	16,9	5,83	22,3	16,9
Natriummolybdat	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	0,08	0,025	0,25
Zinksulfat	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	8,6	2,87	8,6	8,6
Eisensulfat	FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	9,27	27,8	27,8
Natrium-EDTA	Na ₂ -EDTA	37,3	12,4	37,3	37,3
<i>Vitamine und N-Quellen</i>					
L-Glutamin		750	750		750
L-Glycin		2,0	2,0	2,0	2,0
myo-Inositol		100	100	100	50
Nikotinsäure		0,5	0,5	0,5	1,0
Pyridoxin-HCl		0,5	0,5	0,5	
Thiamin-HCl		0,4	0,4	1,0	1,0
Calcium-Panthothenat					0,5
Biotin					0,1
Folsäure					0,01
p-Amino-benzoesäure					1,0
Riboflavin					0,1
Saccharose		30000	30000	30000	30000
Agar (Oxoidagar No.1)		7000	7000	7000	7000

Der pH-Wert des Nährmediums wurde standardmäßig vor Zugabe des Agars mit Natronlauge (NaOH), bzw. Salzsäure (HCl) der Konzentrationen 1, 0,1 , oder 0,01 N auf 5,7 eingestellt. Als Agar wurde, sofern nichts anderes angegeben ist, der Oxoidagar No. 1 mit 7 g / l verwendet. Für einige Bewurzelungsmedien wurde Agar der Firma Roth oder CERO-Agar eingesetzt. Die vorbereiteten Medien wurden in 1000 ml Rundkolben bei 121°C und 110 kPa

für 15 Minuten im Autoklaven (Marke Varioclav Typ 400) sterilisiert und nach dem Abkühlen auf ca. 60°C in der sterilen Werkbank in sterile Gefäße gegossen. Wenn Gibberellinsäure filtersterilisiert zugesetzt wurde, erfolgte dies unmittelbar vor dem Ausgießen in die sterilen Gefäße. Alle Stammlösungen und Nährmedien wurden mit Reinstwasser aus einer NANOpure-Anlage (Fa. Barnstead) hergestellt.

2.4.3.1. Zusammensetzung der Basalmedien

Die Basalmedien sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

2.4.3.2. Etablierungs- und Vermehrungsmedien für *Pyrus pyraeaster*

Es wurden die Medien in die Versuche einbezogen, die sich bei anderen Autoren bereits bewährt hatten (MEIER-DINKEL, 1986; GEBHARDT et al., 1996; GEBHARDT und MEIER-DINKEL, 1998). Es handelte sich um MS-Medien mit den Bezeichnungen 2/8 und 87/29 mit jeweils hohem, bzw. niedrigem BAP-Gehalt, sowie das Medium 87/37, das MS-Salze in erniedrigter Konzentration enthielt, einen mittleren BAP-Gehalt, sowie niedrige Gehalte an IBA und GA₃ aufwies. Dieses Medium wurde außerdem in einer Variante mit Zusatz von 100 mg/l Ascorbinsäure verwendet (Bezeichnung: 87/37 A) (Tabelle 8).

Für die Vermehrungsphase wurde in der Literatur das Medium 87/39 als geeignet ausgewiesen (GEBHARDT et al., 1996; GEBHARDT und MEIER-DINKEL, 1998). Zusätzlich wurden die in Tabelle 8 angegebenen Varianten verwendet.

Tab. 8 Zusammensetzung der Nährmedien für *Pyrus pyraeaster*: Basalmedien, Wachstumsregulatoren und Verwendungszweck

Mengenangaben in mg/l

Bezeichnung	Basalmedium	BAP	IBA	GA ₃	Verwendung
2/8	MS	1,0			Etablierung
87/29	MS	0,2			Etablierung
87/37	MS 2/3	0,5	0,1	0,1	Etablierung
87/37 A*	MS 2/3	0,5	0,1	0,1	Etablierung
87/6	MS	1,0	0,1	0,1	Vermehrung
87/27	MS	0,5	0,1	0,1	Vermehrung
87/39	MS	0,5		0,3	Vermehrung
8/52	WPM	0,5		0,3	Vermehrung

* Zusatz von 100 mg/l Ascorbinsäure

2.4.3.3. Etablierungs- und Vermehrungsmedien für *Sorbus torminalis*

Die Medien mit den Bezeichnungen 2/12 und 87/39 wurden von der NFV-C zur Verfügung gestellt. Sie wurden mit dem Medium mit der Bezeichnung 2/11 verglichen, das sich bei einer anderen Sorbus-Art, dem Speierling (*Sorbus domestica* L.) als geeignet erwiesen hatte (MEIER-DINKEL, 1998). Auf Grund einer persönlichen Mitteilung von Frau Dr. I. BALLA, Budapest, (1999) wurde das Medium 2/11 dahingehend variiert, dass an Stelle der MS-Vitamine die Vitamine nach JACQUIOT (1959) verwendet wurden (Medium-Bezeichnung:

2/22). Alle Medien enthielten MS-Salze in voller Konzentration. In welchen Komponenten sich die Medien unterschieden, veranschaulicht Tabelle 9.

Tab. 9 Zusammensetzung der Nährmedien für *Sorbus torminalis*: Basalmedien, Wachstumsregulatoren und Verwendungszweck

Mengenangaben in mg/l

Bezeichnung	Basalmedium	BAP	IBA	GA ₃	Verwendung
2/12	MS	0,1	0,05		Etablierung
87/39	MS	0,5		0,3	Etablierung
2/11	MS	0,5	0,05		Etablierung
2/22	Jacquot	0,5	0,05		Etablierung
2/5	MS	0,3	0,05		Vermehrung
87/29	MS	0,2			Vermehrung

2.4.3.4. Bewurzelungsmedien

Für die Versuche zur Bewurzelung wurden für *Pyrus pyrausta* und *Sorbus torminalis* die Medien getestet, die in Tabelle 10 dargestellt sind. Es wurden nur solche Mikrostecklinge für die Bewurzelung verwendet, die eine Mindestlänge von ca. 1 cm und keinerlei Deformationen, Hyperhydrität oder sonstige Beeinträchtigung der Vitalität aufwiesen. Die unteren Blätter wurden entfernt.

Tab. 10 Bewurzelungsmedien für *Pyrus pyrausta* und *Sorbus torminalis*

In allen Bewurzelungsmedien wurden die MS-Makro-Elemente auf 1/3 reduziert. Die Mikroelemente wurden in voller Konzentration zugefügt. Ausnahmen hiervon sind die mit * gekennzeichneten Medien 87/03 und 88/09: Sie enthalten MS-Makro- und Mikroelemente in 1/3 Konzentration (Basalmedium MS 1/3).

Bezeichnung	Wachstumsregulatoren [mg/l]		Graphit [g/l]	Agar
	IBA	NAA		
87/03 *	1,0			Oxoid No.1
88/09 *		0,5		Oxoid No.1
90/05	1,0		4	CERO Agar
90/06	1,0			Roth Agar
90/07	0,1			Roth Agar
90/08	1,0			CERO Agar
90/09	0,5	0,5	4	CERO Agar

2.4.4. Akklimationierung und weitere Kultur

Vier Wochen nach dem Aufsetzen auf Bewurzelungsmedium wurde die Bewurzelung bonitiert. Beispiele für das Aussehen der Pflanzen unmittelbar vor dem Pikieren sind auf den Abbildungen 30 und 31 im Anhang zu sehen. Alle vitalen Pflanzen wurden - unabhängig von der Bewurzelung - pikiert. Das für das Pikieren standardmäßig verwendete Substrat wurde aus

Pikiererde und Containersubstrat, beide von der Firma Stender, zu gleichen Teilen gemischt und mit 5 % (v/v) Perlite versetzt.

Die Akklimatisierung erfolgte unter einem Folientunnel. Dort verblieben die Pflanzen so lange, bis sich neue Blätter bildeten. Dann wurden die Pflanzen an niedrigere Luftfeuchtigkeit gewöhnt, indem die Folie des Tunnels an einer Seite zunächst für kurze Zeit, dann nach und nach länger, geöffnet und hochgesteckt wurde. Dieser Abhärtungsprozess war nach ca. 5 – 8 Tagen beendet und die Pflanzen verblieben bis zum Topfen ohne Folientunnel im Gewächshaus.

Nach ca. zwei Monaten wurden alle angewachsenen Pflanzen, die keine sichtbaren Mängel aufwiesen, in Containersubstrat getopft (Abbildung 32 im Anhang). Sie verblieben im Gewächshaus, bis sie eine Mindestgröße von 10 cm erreicht hatten. Später wurden sie in größeren Containern im Freiland weiterkultiviert (Abbildung 33 im Anhang).

2.5. Bonituren, Berechnungen und Definitionen

Eine visuelle Bonitur, die schriftlich festgehalten wurde, erfolgte am Ende jeder Subkultur, bei akklimatisierten Pflanzen vor dem Topfen. Es wurde die Qualität festgehalten und der Zuwachs bewertet. Der Begriff „etabliert“ wurde ausschließlich auf solche Explantate angewendet, die Wachstum und Vermehrung zeigten. Explantate, wie sie vor allem bei Elsbeere auftraten, die nur die Blätter entfalteten aber dann im Rosettenstadium verharrten, galten nicht als etabliert. Maßgebliche **Kriterien zur Bewertung der Pflanzenqualität** waren Form, Farbe und Gesamtzustand im Hinblick auf die weitere Verwendung. Im Einzelnen wurde folgende Merkmale bonitiert:

- Sprossachse: gerade, grün, nicht übermäßig elongiert oder gestaucht, gekrümmt, deformiert oder abgestorben, keine Anzeichen von Hyperhydrität
- Blätter: entfaltet, grün, nicht gekräuselt, deformiert, gelb oder braun, keine Anzeichen von Hyperhydrität
- Wurzeln: Farbe, Anzahl, Länge, Durchmesser.

Bei allen in vitro Arbeiten wurde die Anzahl eingesetzter, verwendbarer, kontaminierter und abgestorbener Explantate pro Gefäß notiert. Daraus wurden die Etablierungs-, Kontaminations- und Bewurzelungsraten berechnet. Alle Angaben beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf die Anzahl eingesetzter Explantate. Der Vermehrungskoeffizient ist das Produkt des Anteils Explantate, welche Achselsprosse bilden, und der durchschnittlichen Anzahl neuer Segmente pro Explantat (DUHOX und DAVIES, 1985; MARTINEZ PULIDO et al., 1990).

Transfer bedeutet Umsetzen der Explantate von einem Kulturgefäß in ein anderes mit frischem Medium. Wenn die Etablierungsphase beendet war, wurden die Explantate dabei in Teile zerschnitten, normalerweise Sprossspitzen und Sprosssegmente. Während der Etablierungsphase zeigten die Explantate oft kein Wachstum oder ein so geringes, dass sie ohne Teilung auf frisches Medium umgesetzt werden mussten. Der erste Transfer mit Teilung kennzeichnete somit das Ende der Etablierungsphase und den Beginn der Vermehrungsphase.

Subkulturen: Die Dauer einer Subkultur betrug in der Regel 4 Wochen. Danach erfolgte der Transfer auf frisches Nährmedium.

Für die Bewertung der Akklimatisierung war die Pflanzenqualität besonders wichtig. Schwach wachsende Pflanzen oder solche mit Deformationen wurden verworfen und gingen daher nicht als „akklimatisiert“ in die Berechnungen ein. Die Akklimatisierung galt als abgeschlossen, wenn die Pflanzen einen Wurzelballen gebildet hatten und getopft wurden.

2.6. KRYOKONSERVIERUNG

2.6.1. Technische Ausstattung

Gefäße für Pflanzenproben

Pflanzenproben wurden in folgenden Kryo-Gefäßen eingefroren:

- Kryoboxen der Fa. Greiner, Größe 13 x 13 x 3 cm (Abbildung 34 im Anhang)
- Zentrifugenröhrchen, 50 ml
- Kryo-Röhrchen mit 2, bzw. 5 ml Volumen

Flüssigstickstoff-Lagercontainer

Die im Folgenden kurz „Lagercontainer“ genannten Gefäße für die Lagerung der Pflanzenproben im Flüssigstickstoff standen in verschiedenen Größen zur Verfügung:

Typen: 4800 RS, 35 HC und 25 LD.

Hersteller: Harsco, Taylor-Wharton Cryogenics, Theodore, Alabama, USA.

Gefrierkammern

Für das stufenweise Einfrieren wurden die Saatgut-Gefrierkammern der NFV-C genutzt. Jeder dieser der Lagerung von forstlichem Saatgut dienenden Räume hatte eine fest eingestellte Temperatur. Die Proben mussten daher nur von einer Kammer zur nächsten gebracht werden, um die nächst niedrigere Temperaturstufe zu erreichen. Es wurden die Kammern mit den Temperaturen -5° , -10° , -20° und -30°C benutzt. Die Temperaturschwankungen lagen bei den drei erstgenannten bei ca. $\pm 1^{\circ}\text{C}$, während bei der letztgenannten ein Ansteigen der Temperatur bis -27°C gelegentlich beobachtet wurde.

2.6.2. Explantatquellen und Erntetermine

2.6.2.1. Explantatquellen und Erntetermine für die Versuche „Einfluss der Geschwindigkeit von Gefrieren und Auftauen“ und „Einfluss von Genotyp und Individuum“

Winterknospen von *Pyrus pyraeaster*

1. Reiser von den am Standort Oldendorf selektierten Explantatspenderbäumen (Bezeichnung 1067-1 bis 1067-15). Ende September 1998 geerntet und verwendet (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.1.).

2. Reiser von 3-jährigen Pfropflingen im Container. Anfang Februar 1999 geerntet und verwendet (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.1.).

3. Reiser von 8-jährigen Pfropflingen des Wildbirnenklonarchivs. Ende Februar 1999 geerntet und verwendet (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.1.).

Winterknospen von *Sorbus torminalis*

Reiser von selektierten Einzelbäumen des Standortes Lutter / Haarwald mit den Bezeichnungen 1077-7 bis 1077-10 (Beschreibung siehe Kapitel 2.1.2.). Anfang Februar 1999 geerntet, im Kühlraum bei 5°C gelagert und nach 4 ½ Monaten verwendet. Die Lagerung geschah aus organisatorischen Gründen.

2.6.2.2. Winterknospen für den Versuch „Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung“

Es wurde das gleiche Material wie für die unter 2.1.4. beschriebenen Versuche verwendet. Die Versuche für die in vitro Kultur nach Kryokonservierung wurden parallel mit den Versuchen zur in vitro Kultur ohne Kryokonservierung durchgeführt. Daher waren Explantatquellen, Reisererntetermine und Lagerung der Reiser gleich. Das Einfrieren der Knospen erfolgte in den Varianten „ohne Lagerung“ unmittelbar nach der Ernte und in den Varianten „mit Lagerung“ nach zweimonatiger Lagerung der Reiser bei 5°C im Kühlraum.

2.6.2.3. In vitro Kulturen

Als Explantate aus in vitro Sprosskulturen für die Versuche zur Kryokonservierung wurden Sprossspitzen, ausgetriebene Achselknospen, sowie Apices verwendet. Für die Gewinnung der Apices wurde unter dem Stereomikroskop der Wachstumskegel zusammen mit den ersten zwei bis drei Blattanlagen in einer Größe von ca. 1 mm präpariert und sofort auf, bzw. in die betreffenden Nährmedien verbracht.

2.6.3. Vitalitätstests

Bei den Versuchen zur Etablierung der Methode wurden unter Bezugnahme auf SAKAI (1960), OKA et al. (1991) und SUZUKI et al. (1997) die Einflüsse des schrittweisen Vorkühlens und der Temperatur des Auftauens geprüft. Die Beurteilung erfolgte bei *Pyrus pyraster* mit dem TTC-Test, bei *Sorbus torminalis* durch Prüfung der in vitro Sprossregeneration.

2.6.3.1. TTC-Test

Eine Prüfung der Vitalität erfolgte mittels TTC- (Tetrazoliumchlorid-) Test (TOWILL und MAZUR, 1974). Das hierfür verwendete 2,3,5-Triphenyl-tetrazolium-chlorid wird von dem Enzym Dehydrogenase, das nur in intakten Zellen aktiv ist, zu einer roten Formazanverbindung reduziert. Diese kann, je nach Objekt, photometrisch quantitativ erfasst werden (Absorptionswellenlänge 485 nm), oder, wie im vorliegenden Fall, visuell unter dem Stereomikroskop bonitiert werden. Letzteres hat den Vorteil, dass die räumliche Verteilung innerhalb des Objekts erkennbar ist.

Fehlermöglichkeiten:

- Da die Dehydrogenase-Aktivität nicht sofort nach dem Absterben der Zellen erlischt, sondern über einen Zeitraum von einigen Stunden abnimmt bevor sie ganz zum Erliegen kommt, wurde aufgetautes Untersuchungsmaterial erst nach 20 bis 24 Stunden getestet.
- Bei grünem Gewebe fällt der Test manchmal negativ aus, auch wenn es sich um vitale Zellen handelt. Dies war hier generell bei Elsbeere der Fall, so dass für diese Baumart keine TTC-Testergebnisse vorgelegt werden können.

Für den Test wird TTC 1%ig (w/v) in 0,05 M Phosphat-Puffer gelöst und mit 0,05 % (v/v) Tween 80 zur Verbesserung der Benetzung versetzt. Die lichtempfindliche Lösung muss dunkel aufbewahrt werden. Die zu untersuchenden Knospen wurden angeritzt, um das Eindringen der Lösung zu gewährleisten. In einem Reagenzglas mit 3 bis 5 ml Lösung wurden je nach Größe 5 bis 10 Knospen für 20 bis 24 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Beurteilung wurden die Knospen einzeln aus der Lösung genommen, der Länge nach aufgeschnitten und sofort unter dem Stereomikroskop bonitiert (Abbildungen 36 a, b, c, d im Anhang). Wichtig war der frische Anschnitt, da an der Luft Oxidationsprozesse einsetzen, die bereits nach wenigen Minuten zu Verbräunungen führen und die Beurteilung erschweren.

Als "vital" wurden die Knospen eingestuft, deren Meristem und angrenzende Leitbündel und Blattprimordien deutlich rot gefärbt waren. Wenn nur Teile dieser Region rot waren oder die rote Farbe nicht deutlich ausgeprägt war, galt die Knospe nicht als vital.

2.6.3.2. Vitalitätstest in vitro

Apices wurden aus den aufgetauten Knospen für die in vitro Kultur präpariert (Abbildung 35 im Anhang). Sie wurden nach vier Wochen auf Vitalität bonitiert, Bezeichnung: Vitalität T4 (= T4-Wert). Hier galt die Entfaltung grüner Blätter als Zeichen der Vitalität. Diese Apices wurden auch dann in die Wertung aufgenommen, wenn sie bakteriell oder mit Pilzen kontaminiert waren. Der Vitalitätsbeurteilung in vitro kam bei den Elsbeeren besondere Bedeutung zu, da bei ihnen kein TTC-Test möglich war (siehe oben).

Elsbeeren hatten häufig eine lange Etablierungsphase, und es stellte sich erst nach mehreren Monaten heraus, ob eine Etablierung erfolgte. Diese Eigenschaft im Zusammenhang mit der insgesamt seltenen Etablierung nach Kryokonservierung führte zur Aufnahme eines weiteren Parameters, der Informationen über das Verhalten der Explantate während des langen, mehrmonatigen Zeitraums zwischen Präparation und endgültiger Etablierung, bzw. Absterben gibt. Daher wurden Elsbeeren nach 12 Wochen (Vitalität T12 = T12-Wert) ein zweites Mal auf Vitalität bonitiert.

Bonitur der Etablierung

Generell wurde ein Explantat erst dann als etabliert bewertet, wenn es zu einem Spross herangewachsen war, der beim Transfer geteilt werden konnte (siehe Definition in Kapitel 2.5). Nach Kryokonservierung kam es häufig vor, dass sich grüne Blätter entfalteten und über mehrere Monate hinweg grün blieben, aber kein Wachstum erfolgte. In den Abbildungen 37 und 38 im Anhang sind solche Explantate neben Explantaten mit beginnendem Sprosswachstum zu sehen. Nicht wachsende, grüne Explantate wurden im T4- und u. U. auch im T12-Wert als vital erfasst, aber bei der Ermittlung der Etablierungsraten nicht

berücksichtigt. Der Prozentsatz etablierter Apices wurde immer auf die Anzahl präparierter Knospen bezogen.

2.6.4. Behandlung von Winterknospen

Ein Fließschema, das den prinzipiellen Ablauf veranschaulicht, befindet sich im Anhang (Abbildung 43).

Schrittweises Einfrieren

Die Reiser wurden unmittelbar vor Beginn der Gefrierprozedur in Stücke geschnitten, deren Länge dem verwendeten Kryo-Gefäß angepasst war (zwischen ca. 1 und 12 cm), und die mit mindestens einer Knospe bestückt waren (Abbildung 34 im Anhang). Bei Verwendung der Kryoröhrchen wurden die Schraubdeckel der Gefäße nur lose aufgesetzt, um ein schnelles Füllen mit Flüssigstickstoff zu gewährleisten.

Bei der Methode des schrittweisen Einfrierens wurden die Gefäße mit den Pflanzenproben nacheinander für jeweils 24 Stunden in die Gefrierkammern mit den Temperaturen -5° , -10° , -20° , -30°C gestellt. Danach wurden sie direkt in den Flüssig-Stickstoff der Lagercontainer verbracht.

Auftauen

Zum Auftauen wurden die Kryo-Gefäße mit den Pflanzenproben aus dem Lagercontainer entnommen und entweder für 24 Stunden in einer Kühlkammer von -5°C oder $+2^{\circ}\text{C}$ ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) oder bei Raumtemperatur von ca. 22°C aufgestellt („langsames Auftauen“), oder sie wurden für 2 bis 3 Minuten in ein 40°C – Wasserbad gestellt („schnelles Auftauen“). Letzteres wurde mit Winterknospen aber nur im Rahmen der Vorversuche durchgeführt. Danach war „langsames Auftauen“ die Standardauftaumethode. Knospen für die *in vitro* Kultur wurden unmittelbar danach weiter verarbeitet, während Knospen für den TTC-Vitalitätstest einen Tag bei Raumtemperatur ruhten, bevor der Test durchgeführt wurde.

Nachbehandlungen

Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden aufgetaute Winterknospen für die *in vitro* Kultur wie nicht eingefrorene Winterknospen behandelt: Sie wurden oberflächensterilisiert, unter dem Stereomikroskop präpariert, auf Etablierungsmedium gesetzt und in den Klimaraum gestellt (Abbildung 35 im Anhang).

Mit dem Ziel, die niedrigen Etablierungsraten von *Sorbus torminalis* zu verbessern, wurden folgende Einflüsse geprüft, wobei als Etablierungsmedium immer das Medium 2/11 benutzt wurde:

- Dunkelheit während der ersten zwei Wochen nach Präparation, um möglicherweise ablaufende photooxidative Prozesse zu behindern, die besonders während der ersten Tage nach dem Auftauen an Zellen, die zunächst nur leicht geschädigt sind, größere Schäden verursachen könnten (BENSON, persönl. Mitteilung).
- Zusatz von 2 g/l Aktivkohle im Etablierungsmedium, um eventuell von den Pflanzen gebildete Stresssubstanzen, wie z.B. Ethylen, zu adsorbieren und damit ihre wachstumshemmende Wirkung zu mindern.
- Verwendung eines Agarosetropfens, der von flüssigem Etablierungsmedium umgeben ist, an Stelle des festen Etablierungsmediums. Diese Methode wird in anderem

Zusammenhang als sehr schonend für besonders empfindliches Gewebe empfohlen (siehe 2.6.5.6. Droplet-Methode).

- Zusatz von Gibberellinsäure (GA_3) zum Etablierungsmedium in den Konzentrationen 0,1 , 1,0 und 5,0 mg / l, um die Sprosstreckung zu fördern.

2.6.5. Behandlung von in vitro Material

2.6.5.1. Kälteakklimatisierung

Ausgangsmaterial waren Pflanzen aus der Kühllagerung, die für 3 - 6 Monate im Kühlraum bei +5°C gestanden hatten. Von diesen Kulturen wurden Sprosssegmente im Kulturraum bei +24°C auf Vermehrungsmedien angetrieben und die davon präparierten Apices im Klimaschrank einer weiteren Kälteakklimatisierung bei +4°C, bzw. 0°C mit unterschiedlicher Dauer (zwischen 2 Stunden und 5 Tagen) unterzogen. Bei diesem Schritt wurden Medien mit Dehydrierungs- oder Frostschutz-Zusätzen verwendet.

In den Versuchen, in denen mit der Einkapselung in Alginat (siehe Abschnitt 2.6.5.2.) gearbeitet wurde, wurden als Ausgangsmaterial Sprosskulturen in der Vermehrungsphase verwendet. Von diesen wurde 2 Wochen nach dem letzten Umsetzen die Aufteilung auf die beiden Kälteakklimatisierungstemperaturen +10°C und +4°C vorgenommen.

2.6.5.2. Einkapseln in Alginatkugeln und Trocknen

Ein Fließschema, das den prinzipiellen Ablauf veranschaulicht, befindet sich im Anhang (Abbildung 44).

Das Einkapseln von Apices in Alginatkugeln ist eine gängige Methode geworden, um pflanzliche Zellen auf das Einfrieren vorzubereiten, seit sie von DEREUDDRE et al. (1990) entwickelt wurde. Das Prinzip besteht darin, dass Apices in Alginatkugeln eingebettet werden in denen durch Trocknen die Saccharose-Konzentration erhöht wird. Dadurch werden auch die Pflanzenzellen langsam und schonend osmotisch dehydriert mit der Folge, dass beim Einfrierprozess eine Vitrifizierung stattfindet anstelle von unerwünschter Eiskristallbildung.

Alginatkugeln haben außerdem den Vorteil, dass sie und mit ihnen die Apices einfach zu handhaben sind, vor allem wenn größere Stückzahlen zu bearbeiten sind. Die Apices liegen geschützt in den Kugeln und werden beim Überführen von einer Lösung in die andere nicht mechanisch beschädigt. Der Nachteil besteht darin, dass die Herstellung der Kugeln umständlich und zeitaufwendig ist. Es erfordert auch eine gewisse Übung und große Sorgfalt, die Kugeln in gleichmäßiger Größe und Form herzustellen. Dies ist wichtig, da die Trocknungseigenschaften davon stark beeinflusst werden. Auch für die Wiederholbarkeit von Experimenten ist dieser Punkt unerlässlich.

Herstellung von Alginatkugeln

Für die Herstellung von Alginatkugeln werden zwei Lösungen vorbereitet. Lösung 1 ist ein calciumfreies flüssiges Kulturmedium mit 3% (w/v) Alginat. Lösung 2 ist ein flüssiges Kulturmedium mit 100 mM Calciumchlorid CaCl_2 . Die Apices werden präpariert und an geeigneter Stelle gesammelt (in Flüssigmedium oder auf halbfestem Medium). Wenn alle benötigten Apices präpariert sind, werden sie in die Lösung 1 mit Alginat gegeben. Mit einer Eppendorf-Pipette werden ca. 3 ml Alginatlösung mit 2 bis 4 Apices aufgezogen und in

einzelnen Tropfen in die calciumhaltige Lösung 2 getropft. Die Tropfen verfestigen sich zu einem Gel, sobald sie mit den Calcium-Ionen in Berührung kommen, und kapseln so die Apices ein. Nach 20 bis 30 Minuten ist das Gel stabilisiert und die Alginatkugeln können entnommen und weiter bearbeitet werden.

Folgende **Medien** wurden für die Einkapselung verwendet:

Wildbirne: 2/8, 87/29, 87/39 (siehe S. 22)

Elsbeere: 2/11, 87/29, 87/38 (siehe S. 23)

Trocknen von Alginatkugeln

Das Trocknen der Alginatkugeln wurde mit drei Methoden getestet:

1. **Methode Luftstrom:** Offene Petrischalen mit je 10 Alginatkugeln wurden in den sterilen Luftstrom der Werkbank gestellt.
2. **Methode Silicagel direkt:** 20 ml - Gläser mit Schraubdeckelverschluss wurden mit 8 g Silicagel gefüllt. Pro Glas wurden 10 Alginatkugeln auf Filterpapier gelegt, welches sich direkt auf dem Silicagel befand, so dass die Alginatkugeln nur durch das Filterpapier vom Silicagel getrennt waren.
3. **Methode Exsiccator:** Die Größe des Exsiccators betrug 200 mm im Innen-Durchmesser. Er besaß keine Vorrichtung für das Anlegen eines Unterdrucks. Er wurde mit 790 g Silicagel gefüllt. In ca. 5 cm Höhe über dem Silicagel befand sich eine perforierte Keramikscheibe. Darauf wurden offene Petrischalen gestellt, in denen sich die Alginatkugeln zu je 10 Stück pro Petrischale befanden. Der Exsiccator wurde immer nur mit 6 Petrischalen bestückt, damit die für den Feuchtigkeitsaustausch notwendige freie perforierte Fläche der Keramikscheibe immer ungefähr gleich groß war.

Bei den ersten Trocknungsversuchen wurde immer frisch aktiviertes Silicagel verwendet. Lediglich in einem Versuch wurde Silicagel für zwei Trocknungsserien an zwei aufeinanderfolgenden Tagen benutzt. Dadurch flachte die Trocknungskurve erheblich ab, so dass bei allen weiteren Versuchen wieder nur frisch aktiviertes Silicagel eingesetzt wurde.

Bestimmung des Trocknungsgrades

Zur Bestimmung des Trocknungsgrades wurden die Alginatkugeln vor, während und nach der Trocknung auf der Analysenwaage gewogen. Hierfür wurde immer eine Petrischale dem Exsiccator entnommen, komplett mit Alginatkugeln gewogen und dann zurück in den Exsiccator gestellt, der zwischendurch immer wieder geschlossen wurde. Der Trocknungsgrad wurde in % des Frischgewichts angegeben.

2.6.5.3. Osmotische Dehydrierung

Die osmotische Dehydrierung wird durch den Zusatz osmotisch wirksamer Substanzen zum Nährmedium erreicht. Nach der Standardmethode wurde Saccharose in einer Konzentration von 0,75 M zugesetzt. Die Einwirkdauer betrug zwischen 2 Stunden und 2 Tagen.

Da Elsbeeren sehr empfindlich auf die osmotische Dehydrierung mittels Saccharose reagierten, wurden mit ihnen, basierend auf dem Medium 2/11, zusätzlich folgende Varianten getestet:

- Zugabe von Mannitol, Sorbitol oder Saccharose in den Konzentrationen 0,4 M und 1,0 M, Einwirkdauer 1 und 3 Tage.

- Schrittweises Dehydrieren durch Zugabe von Mannitol, Sorbitol oder Saccharose in den Konzentrationen 0,1, 0,4, 0,7 und 1,0 M. Einwirkdauer auf jeder Stufe 1 Tag, bevor auf die nächsthöhere Stufe umgesetzt wurde. Auf der Endstufe (1,0 M) Einwirkdauer von 1 und 3 Tagen.

Für die Dauer der Dehydrierung befanden sich die Kulturen im Klimaschrank bei +5°C und 12 Stunden Belichtung. Danach wurde auf das Medium 2/11 umgesetzt und im Klimaraum weiterkultiviert.

2.6.5.4. Untersuchungen zur Toxizität von DMSO

DMSO (Dimethylsulfoxid) ist ein Frostschutzmittel, dessen Wirkungsweise noch nicht ganz geklärt ist. In der Literatur finden sich viele Hinweise auf seinen Einsatz in Kryokonservierungsprozeduren, aber ebenso auf seine Toxizität.

Es wurde ein Versuch zur Ermittlung der Toxizität, bzw. Verträglichkeit von DMSO durchgeführt: Filterpapier wurde in Petrischalen mit DMSO in den Konzentrationen 0, 5, 10 und 20% getränkt und Apices für 1, 2, 3, 4 und 17 Stunden auf diesem Filterpapier belassen. Danach wurden die Apices in Flüssigmedium (Medium 87/29) gespült und auf einen Agarostropfen gesetzt, um den herum dasselbe Medium pipettiert wurde (Abbildung 39 im Anhang). Nach 2 Wochen wurden sie auf festes 87/29-Medium umgesetzt. Die *Sorbus torminalis* – Apices wurden für diesen Versuch in Alginat eingekapselt (Abbildung 40 im Anhang).

Aufgrund der Ergebnisse des Verträglichkeitsversuchs wurde in Folgeversuchen DMSO in einer Konzentration von 5% eingesetzt.

2.6.5.5. Vitrifizierung

Vorbehandlung

In einigen Versuchen ging der Vitrifizierung eine Vorbehandlung mit einem MS – Flüssigmedium voraus, dem 0,4 M Saccharose und 2 M Glycerin zugesetzt waren. Die Einwirkungszeit betrug 20 Minuten.

Vitrifizierung

Für das Vitrifizieren wurde die PVS2-Lösung nach YAMADA et al. (1991) eingesetzt. Zusammensetzung (pro l fertige Lösung):

- 107 g Saccharose
- 300 ml Glycerin
- 150 g Ethylenglycol
- 150 ml DMSO
- pH 5,8.
- gelöst in flüssigem MS-Medium ohne Hormone

Die Einwirkungszeit wurde mit 0, 5, 15 und 20 Minuten geprüft.

2.6.5.6. Droplet-Methode

Ein Fließschema, dass den prinzipiellen Ablauf veranschaulicht, befindet sich im Anhang (Abbildung 45).

Die Droplet- oder Tröpfchen-Methode wurde von SCHÄFER-MENUHR und MIX-WAGNER (1996) für das Einfrieren von Kartoffeln in der Kryo-Genbank der Forschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Braunschweig zur Routinemethode entwickelt. Sie kombiniert die Vitrifizierung mit einer einfach zu handhabenden Einfrier-Technik.

Ein Styroporgefäß mit passendem Einsatz für Kryoröhrchen wurde mitsamt den Kryoröhrchen mit Flüssigstickstoff gefüllt. Hitzesterilisierte Aluminiumfolien-Streifen (Größe: passend für die Kryoröhrchen, ca. 5 x 20 mm) wurden mit der matten Seite nach oben gelegt und mit 4 bis 6 kleinen Tropfen PVS2-Lösung aus der 25 µl-Eppendorfpipette versehen. In jeden dieser Tropfen („droplet“) wurde ein Apex gelegt. Die Aluminiumstreifen wurden dann in den mit Flüssigstickstoff gefüllten Kryoröhrchen platziert, bis zu drei Streifen pro Röhrchen.

2.6.5.7. Auftauen und Nachbehandlung

Eine Auftaumethode bestand darin, die Kryoröhrchen in Bechergläser zu legen, die mit Flüssigmedium gefüllt in einem 45°C-Wasserbad standen. Nach 1 bis 2 Minuten wurden die Kryoröhrchen herausgenommen und in Bechergläser gegeben, die mit Flüssigmedium von Raumtemperatur gefüllt waren. Bei beiden Temperaturen wurde Flüssigmedium statt Wasser genommen für den Fall, dass die Kryoröhrchen nicht ganz dicht verschlossen waren. Nach 2 – 3 Minuten wurden die Kryoröhrchen geöffnet und die Apices einmal in Spülmedium (hormonfreies MS-Flüssigmedium mit 1,2 M Saccharose) gespült, bevor sie auf halbfestes Etablierungsmedium gesetzt wurden.

Bei der anderen Auftaumethode wurden die Kryoröhrchen geöffnet während sie sich noch im Flüssigstickstoff befanden. Der Aluminiumstreifen mit den gefrorenen Apices („droplets“) wurden mit einer Pinzette entnommen und direkt in Bechergläser, die zur Hälfte mit Spülmedium von Raumtemperatur gefüllt waren, getaucht. Das Spülmedium war ein hormonfreies flüssiges MS-Medium mit 0,4 M Saccharose. Es wurde zweimal im Abstand von 5 Minuten gewechselt. Dann wurden die Apices entweder gleich auf halbfestes Etablierungsmedium (Medium 87/37 für Wildbirne, Medium 87/29 oder 2/11 für Elsbeere) gesetzt oder erst auf einen Agarostropfen, der von flüssigem Etablierungsmedium umgeben war, und von dort nach 2 Wochen auf festes Etablierungsmedium.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse von in vitro Kulturen ohne Kryokonservierung

3.1.1. Etablierung

3.1.1.1. Etablierung von *Pyrus pyraaster*: Evaluierung unterschiedlicher Explantatquellen

Winterknospen

Die ersten Versuche zur Etablierung ergaben sehr niedrige Etablierungserfolge (Tabelle 11).

Tab. 11 Etablierung von Apices von *Pyrus pyraaster*-Winterknospen

Medium: 87/37A (MS 2/3 mit 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃, 10 mg/l Ascorbinsäure)

Klonnummer	Anzahl präpariert	Anzahl etabliert	Anzahl kontaminiert	Anzahl abgestorben
320-1	20	0	17	3
320-2	20	0	4	16
320-3	20	0	12	8
320-4	20	3	3	17
320-5	20	0	2	18
320-6	20	0	19	1
320-7	20	2	4	14
320-8	20	1	0	19
320-9	20	0	3	17
320-10	20	0	2	18
320-11	20	0	0	0
320-12	20	0	10	10
Summe	240	6	70	164
%	100	3	29	68

Von 12 Klonen wurden 3 (= 25%) etabliert. Die Etablierungsrate bezogen auf die Anzahl Knospen betrug 3%. Die maßgebliche Ursache für den niedrigen Etablierungserfolg war das Verbräunen von 68% der Explantate. Die Kontaminationsrate betrug 29%. Die Etablierungsphase dauerte 20 Wochen.

Grüne Knospen von Pfropflingen

Es wurde geprüft, ob als Alternative zu Winterknospen die grünen Knospen der Frühjahrs-Austriebe von Pfropflingen als Ausgangsexplantate verwendet werden können. In Tabelle 12 sind die Ergebnisse der Etablierungsversuche von 2 Ernteterminen dargestellt. Beim ersten Termin konnten drei von fünf Klonen etabliert werden. Sowohl die Etablierungs- als auch die Kontaminationsrate betrug 5% bezogen auf die Anzahl Knospen. Beim zweiten Termin verbräunten alle Explantate, und es wurde kein Klon etabliert.

Nach 18-wöchiger Etablierungsphase begann die Vermehrung. Die Vermehrungskoeffizienten pro Transfer lagen zwischen 1,2 und 4,0. Der Durchschnitt der ersten drei Transfers betrug 1,9 bis 2,3.

Tab. 12 Etablierung von *Pyrus pyraaster* : Grüne Knospen von Pfropflingen

Medium: 87/37A (MS 2/3 mit 0,5 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃, 10 mg/l Ascorbinsäure)

KW = Kalenderwoche (des Kulturbeginns, bzw. der Bonitur)

Vk 1-3 [xq] = Mittelwert der Vermehrungskoeffizienten von drei Transfers (KW 38 bis KW 50)

	Anzahl präpariert		Anzahl kontaminiert		Anzahl etabliert in KW 38		Anzahl Sprosse in KW 50	Vk 1-3 [xq]
	KW 15	KW 27	KW 15	KW 27	KW 15	KW 27	KW 15	KW 15
Klonnummer								
Alf Ei 4-6	36	44	0	0	0	0	0	0
Fall 0-6	48	47	0	0	0	0	0	0
Lapp 207-3	31	58	3	0	8 (26%)	0	52	1,9
Nord 7-18	31	60	4	0	1 (3%)	0	12	2,3
Steck 0-11	59	55	3	0	2 (3%)	0	13	1,9
Summe / xq	205	264	10		11		77	2,0
%	100		5		5			

3.1.1.2. Etablierung von *Sorbus torminalis*: Einfluss der Jacquot-Vitamine

Es wurde geprüft, ob durch die Vitamine nach JACQUIOT (1959) bessere Etablierungsraten zu erzielen sind als bei Verwendung der Vitamine nach MURASHIGE und SKOOG (1962). (Vgl. Kap. 2.4.3.1. Basalmedien). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tab. 13 Einfluss der Vitamin-Zusammensetzung der Nährmedien auf die Etablierung von Apices von *Sorbus torminalis* – Winterknospen

Medien: 2/11 (Basalmedium MS mit Vitaminen nach Murashige-Skoog) und 2/22 (Basalmedium Jacquot mit Vitaminen nach Jacquot). Die Bonitur erfolgte 8 Wochen nach der Präparation.

Klonnummer	Basal-medium	Anzahl präpariert	Anzahl kontaminiert	Anzahl etabliert
77-1	MS	10	0	0
	Jacquot	10	0	0
77-2	MS	10	1	1
	Jacquot	10	0	0
77-3	MS	10	0	3
	Jacquot	10	0	0
77-4	MS	10	0	0
	Jacquot	10	0	0
77-5	MS	10	1	0
	Jacquot	10	0	0
77-6	MS	10	8	2
	Jacquot	10	6	0

Fortsetzung Tab. 13

Klonnummer	Basal-medium	Anzahl präpariert	Anzahl kontaminiert	Anzahl etabliert
77-7	MS	10	2	8
	Jacquot	10	10	0
77-8	MS	10	3	4
	Jacquot	10	1	6
77-9	MS	10	9	1
	Jacquot	10	1	0
77-10	MS	10	0	1
	Jacquot	10	0	0
77-11	MS	10	1	4
	Jacquot	10	0	6
77-12	MS	10	0	3
	Jacquot	10	0	6
77-13	MS	10	0	4
	Jacquot	10	0	0
77-14	MS	10	0	1
	Jacquot	10	0	0
77-15	MS	10	1	0
	Jacquot	10	0	1
77-16	MS	10	0	9
	Jacquot	10	0	9
77-17	MS	10	0	5
	Jacquot	10	0	7
77-18	MS	10	0	3
	Jacquot	10	0	3
77-19	MS	10	0	1
	Jacquot	10	1	6
77-20	MS	10	1	6
	Jacquot	10	2	5
Summe	MS	200 (100%)	27 (13%)	56 (28%)
Summe	Jacquot	200 (100%)	21 (11%)	49 (25%)

Unter dem Einfluss der MS-Vitamine erfolgte aus 28% der Apices Sprosswachstum. 72% waren kontaminiert oder verbräunten. Unter dem Einfluss der Jacquot-Vitamine erfolgte aus 25% der Apices Sprosswachstum und 75% konnten nicht etabliert werden.

Von den 20 geprüften Klonen wuchsen die Explantate von acht Klonen ausschließlich auf MS-Medium, von einem Klon ausschließlich auf Jacquot-Medium, von acht Klonen auf beiden Medien. Die Explantate von drei Klonen wuchsen nicht.

Gesamtergebnis:

- 16 Klone (80%) auf MS-Medium etabliert,
- 9 Klone (45%) auf Jacquot-Medium etabliert.

3.1.2. Optimierung der Vermehrung

3.1.2.1. Vermehrung von *Pyrus pyrastra*: Evaluierung von 3 Nährmedien

Dieser Versuch wurde mit den zur Verfügung gestellten in vitro Kulturen durchgeführt (vgl. Kap. 2.1.1.). Die vier Klone mit den Bezeichnungen 5, 176-1, 439-28, 59-2 wurden auf dem Medium 87/6 vorkultiviert. (Zusammensetzung des Mediums 87/6: MS-Basalmedium, 1 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃)

Geprüft wurde, ob im Vergleich mit Medium 87/6 die Medien 87/39 und 8/52 zu höheren Vermehrungskoeffizienten führen. Medium 87/39 unterschied sich von 87/6 durch eine andere Hormonzusammensetzung, nämlich weniger BAP, mehr GA₃ und kein IBA. Medium 8/52 enthielt die gleichen Hormone wie Medium 87/39 unter Verwendung des WPM-Basalmediums an Stelle des MS-Basalmediums (siehe auch: Zusammensetzung der Nährmedien, Kap. 2.4.3.2.).

Die drei Medien wurden mit je 32 Einzelsprossen pro Klon geprüft. Bei 3 Transfers, die in jeweils vierwöchigem Abstand durchgeführt wurden, wurden die Vermehrungskoeffizienten erfasst. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Bei Verwendung von Medium 87/6 stiegen die Vermehrungskoeffizienten (Mittelwert aller Klone) von 1,3 beim ersten Transfer auf 2,6 beim dritten Transfer. Der Mittelwert aller Transfers betrug 1,9.

Tab. 14 Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyrastra* auf 3 Nährmedien

Zusammensetzung der Medien:

Medium 87/6 MS-Basalmedium, 1,0 mg/l BAP, 0,1 mg/l IBA, 0,1 mg/l GA₃

Medium 87/39 MS-Basalmedium, 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l GA₃

Medium 8/52 WPM-Basalmedium, 0,5 mg/l BAP, 0,3 mg/l GA₃

Vk [xq] = Mittelwert der Vermehrungskoeffizienten

xq = Mittelwert

Medium	Transfer	Klon 5	Klon 176-1	Klon 439-28	Klon 59-2	Vk [xq]
87/6	1	1,1	0,8	2,1	1,1	1,3
	2	1,7	1,7	1,8	2,4	1,9
	3	2,5	3,2	2,4	2,3	2,6
xq		1,8	1,9	2,1	1,9	1,9
87/39	1	2,6	1,8	1,5	1,8	1,9
	2	1,7	1,4	1,2	1,5	1,5
	3	1,3	(nicht erfasst)	1,3	1,6	1,4
xq		1,9	1,6	1,3	1,6	1,6
8/52	1	3,1	2,7	1,7	1,9	2,4
	2	1,1	1,8	0,7	1,0	1,1
	3	1,2	(nicht erfasst)	(nicht erfasst)	0,9	1,1
xq		1,8	2,3	1,2	1,3	1,6

Die auf Medium 87/39 erzielten Vermehrungskoeffizienten sanken von 1,9 auf 1,4. Der Mittelwert betrug 1,6.

Auf Medium 8/52 wurde beim ersten Transfer ein durchschnittlicher Vermehrungskoeffizient von 2,4 ermittelt. Bei den folgenden Transfers betrug er 1,1. Der Mittelwert betrug 1,6.

Nach weiteren Transfers, die nicht in Zahlen dokumentiert sind, zeigten die Sprosse des Klons 439-28 auf dem Medium 87/6 zunehmend Hyperhydrität. Ein Wechsel auf das Medium 87/39 führte zur Rückbildung der Hyperhydrität.

Im Folgenden wurde Medium 87/6 als Standardmedium für Wildbirne verwendet. Wenn Hyperhydrität auftrat, wurde auf Grund der Beobachtungen an Klon 439-28 auf Medium 87/39 gewechselt.

3.1.2.2. Vermehrung von *Pyrus pyrastra* : Einfluss von Kulturgefäß und Medium

In diesem Versuch wurde das Wachstum von Wildbirne in Honiggläsern im Vergleich zu den standardmäßig verwendeten Weckgläsern geprüft. In den Weckgläsern wurden die beiden Vermehrungsmedien 87/6 und 87/27 verwendet, in den Honiggläsern nur 87/6. Die visuelle Bonitur ergab, dass Honiggläser im Vergleich zu Weckgläsern unabhängig vom Medium das Wachstum begünstigten, da die Pflanzen größer und kräftiger waren. Obwohl sich Kondenswasser an den Seitenwänden bildete, was in Weckgläsern nicht geschah, wurde kaum Hyperhydrität beobachtet.

Tab. 15 Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyrastra* in Abhängigkeit vom Kulturgefäß (Glas) und Nährmedium über 6 Transfers

Hgl = Honigglas; Wgl = Weckglas; n.e. = nicht erfasst

Vk = Vermehrungskoeffizient; $Vk[xq]$ = Mittelwert der Vermehrungskoeffizienten

Klon-nummer	Glas und Medium	Transfervummer						Vk [xq]
		1	2	3	4	5	6	
59-2	Hgl 87/6	1,80	1,31	1,77	1,98	2,16	2,67	1,95
	Wgl 87/6	1,47	0,94	1,04	1,42	1,73	1,79	1,40
	Wgl 87/27	1,42	0,96	1,07	1,04	1,04	1,63	1,19
439-28	Hgl 87/6	1,27	0,96	1,18	1,08	1,14	1,29	1,15
	Wgl 87/6	0,66	0,14	1,00	1,00	1,00	1,00	0,80
	Wgl 87/27	0,72	0,32	1,00	0,71	1,00	1,00	0,79
B 414	Hgl 87/6	2,00	1,14	1,31	1,72	2,85	2,18	1,87
	Wgl 87/6	0	-	-	-	-	-	0
	Wgl 87/27	0,47	1,00	1,17	0,71	1,17	1,29	0,97
PER 54	Hgl 87/6	3,27	3,66	2,85	3,53	4,08	4,88	3,71
	Wgl 87/6	n.e.	2,15	1,31	1,58	3,38	2,26	2,14
	Wgl 87/27	1,88	1,74	1,38	1,17	1,51	1,68	1,56

Die Klone 59-2, 439-28, B 414 und PER 54 (vgl. Kap. 2.1.1. In vitro Kulturen) wurden mit 32 Einzelsprossen je Versuchsglied verwendet.

Die über sechs Transfers ermittelten Vermehrungskoeffizienten lagen bei den in Honiggläsern kultivierten Pflanzen im Durchschnitt immer über denen in Weckgläsern (Tabelle 15). Im Durchschnitt über alle Klone und alle Transfers betrug der Vermehrungskoeffizient bei Honiggläsern 2,2 und bei Weckgläsern 1,4. Diese Differenz von 0,8 zwischen den beiden Glasarten war erheblich größer als die Differenz zwischen den beiden Vermehrungsmedien 87/6 und 87/27, beide in Weckgläsern. Hier betrug der Unterschied nur 0,3, mit 87/6 als dem besseren Medium.

Wie unterschiedlich die Klone auf die Behandlungen reagierten, ist in Tabelle 15 veranschaulicht. Gemeinsam ist ihnen, dass aus der Kultur in Honiggläsern immer die höheren Vermehrungskoeffizienten resultierten. Klon B 414 war auf dem Medium 87/6 nur in Honiggläsern kultivierbar. In Weckgläsern starben die Sprosse. In Weckgläsern auf Medium 87/27 konnte er am Leben erhalten, jedoch nicht vermehrt werden. Der Vermehrungskoeffizient über alle Transfers betrug 0,97.

3.1.2.3. Vermehrung von *Sorbus torminalis*: Einfluss des Explantattyps

Die Vermehrungskoeffizienten, die in dem Versuch zum Einfluss des Explantattyps (vgl. 2.4.2.) ermittelt wurden, sind in Abb. 1 dargestellt. Es fällt der Wechsel zwischen hohem und niedrigem Vermehrungskoeffizient von Transfer zu Transfer auf. Bei Verwendung von mononodialen Sprossachsensegmenten waren die Amplituden erheblich stärker ausgeprägt als bei Verwendung von Einzelsprossen. Die Pflanzen verhielten sich während des ganzen Versuchs normal und zeigten keine Auffälligkeiten wie z.B. Verbräunungen oder Deformationen.

Im Durchschnitt über alle Transfers lagen die Vermehrungskoeffizienten für mononodiale Segmente bei 2,4 und für Einzelsprosse bei 2,0.

Dies bedeutet, dass theoretisch bei einer Ausgangsmenge von z.B. 10 Sprossen mit der Segmentierung nach dem vierten Transfer doppelt so viele Sprosse ausgebildet sein können wie bei Verwendung von Einzelsprossen. Nach einem Jahr Kulturzeit (entsprechend 13 Transfers, wie in dem Versuch) können aus 10 Sprossen bei Segmentierung 976.000 Sprosse entstanden sein und damit fast die zehnfache Menge wie bei Einzelsprossen (99.400 Sprosse).

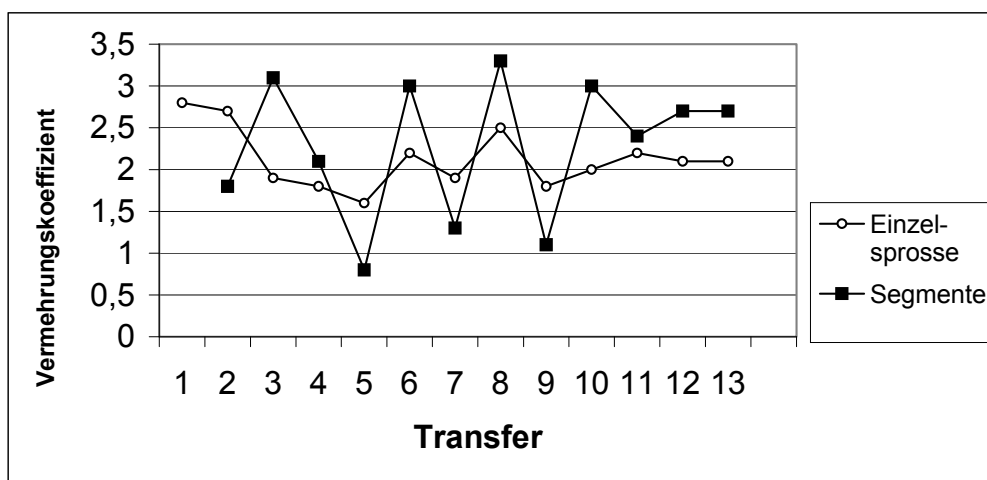


Abb. 1 Vermehrungskoeffizienten von *Sorbus torminalis* bei Verwendung der Explantattypen „Einzel-sprosse“ und „mononodiale Sprossachsensegmente (Segmente)“

Es wurden die Klone 76, 85, 146, 163, 243 und 283 verwendet.

3.1.2.4. Vermehrung von *Sorbus torminalis*: Vergleich von Sprosskulturen unterschiedlichen Alters

Es handelt sich hier um einen Vergleich der Vermehrung von Sprosskulturen, die aus Winterknospen für den Versuch „Einfluss der Jacquot-Vitamine auf den Etablierungserfolg“ entstanden waren, hier Gruppe 1 genannt, mit den zur Verfügung gestellten in vitro Kulturen (vgl. 2.1.2.), hier Gruppe 2 genannt. Beide waren auf dem Medium 2/5 kultiviert worden. Die Vermehrungskoeffizienten der Gruppe 1 wurden in Fortsetzung des bereits geschilderten Versuchs „Einfluss der Jacquot-Vitamine auf den Etablierungserfolg“ (Kap. 3.1.1.2.) erhoben. Die Vermehrungskoeffizienten der Gruppe 2 sind in dem Versuch „Einfluss des Explantattyps“ (Kap. 3.1.2.3.) dargestellt worden.

Tab. 16 Vergleich der Vermehrungskoeffizienten zwischen zwei Gruppen von etablierten *Sorbus torminalis* - Sprosskulturen

Gruppenmerkmal	Gruppe 1	Gruppe 2
Alter der Spenderbäume bei Explantatentnahme	23 Jahre	4 Jahre
Anzahl Klone	17	6
Laboralter *	1 Jahr	4 bis 8 Jahre
Vermehrungskoeffizient		
Durchschnitt	1,3	2,0
Minimum – Maximum	1,0 – 1,7	1,1 – 2,9

* Laboralter = Anzahl Jahre seit Etablierung in vitro im Labor

Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, sowie die Unterschiede in der Vermehrung sind in Tabelle 16 zusammengestellt. Bei der Ermittlung der durchschnittlichen Vermehrungskoeffizienten wurde nur die Verwendung der Einzelsprosse berücksichtigt, nicht die mononodialen Segmente. Die Vermehrungskoeffizienten der Explantate der Gruppe 1

betragen 1,3. Die der Gruppe 2 ergaben 2,0. Die geringsten ermittelten Vermehrungskoeffizienten lagen mit 1,0 und 1,1 sehr eng beieinander, während die höchsten Werte mit 1,7 und 2,9 um mehr als den Faktor 1,7 differierten. Es bleibt zu diskutieren, ob diese Unterschiede auf das Alter der Spenderbäume oder die Anzahl Jahre seit Etablierung in vitro im Labor („Laboralter“) zurückzuführen sind.

3.1.3. Bewurzelung und Akklimatisierung

3.1.3.1. *Pyrus pyraster*: Einfluss von Kulturgefäß und Medium auf Bewurzelung und Akklimatisierung

Im Anschluss an den Versuch zum Einfluss des Kulturgefäßes und des Mediums auf die Vermehrungskoeffizienten (vgl. Kap.3.1.2.2.) wurden die Pflanzen auf das Bewurzelungsmedium 90/05 in Weckgläsern umgesetzt. Tabelle 17 zeigt, wie unterschiedlich die Klone reagierten. Am ähnlichsten waren sich die Klone PER 54 und 59-2, die auf Grund ihrer hohen Vermehrungsraten mit großen Stückzahlen, die zwischen 48 und 206 pro Versuchsglied lagen, geprüft werden konnten und daher am aussagekräftigsten sind. Bei beiden Klonen folgten auf die Vermehrung in Weckgläsern mit Medium 87/27 die höchsten Akklimatisierungsraten.

Tab. 17 Einfluss von Kulturgefäß und Medium während der Vermehrung auf die Bewurzelungs- und Akklimatisierungsraten von *Pyrus pyraster*.

Hgl = Honigglas; Wgl = Weckglas

Versuchsablauf: 1) Vermehrung in den Gefäßen Honigglas oder Weckglas auf den Medien 87/6 oder 87/27. 2) Bewurzelung in Weckgläsern auf Medium 90/05. 3) Pikieren und Akklimatisieren im Gewächshaus.

Gefäß und Medium während der Vermehrung	Klon-nummer	Anzahl Mikro-stecklinge gesamt	Anzahl bewurzelt	Anzahl akklimatisiert
Hgl 87/6	PER 54	206	16	52
	59-2	131	16	31
	439-28	66	31	34
	B 414	77	55	29
Wgl 87/6	PER 54	62	9	24
	59-2	98	12	29
	439-28	3	0	2
	B 414	9	0	0
Wgl 87/27	PER 54	48	15	24
	59-2	54	9	22
	439-28	5	0	0
Gesamt				
Hgl 87/6		480	118 (25 %)	146 (30 %)
Wgl 87/6		172	21 (12 %)	55 (32 %)
Wgl 87/27		107	24 (22 %)	46 (43 %)

Die Klone 439-28 und B 414 waren in Weckgläsern kaum zu kultivieren gewesen, so dass nur zwischen 3 und 9 Mikrostecklinge für den Bewurzelungsversuch zur Verfügung standen. Bei Verwendung von Medium 87/27, das bei den Klonen PER 54 und 59-2 zu den höchsten Akklimatisierungsraten führte, starben 439-28 und B 414 ab. Von Klon B 414, der auf Medium 87/27 überhaupt nicht wuchs, wurden akklimatisierungsfähige Pflanzen ausschließlich nach der Vermehrung in Honiggläsern erzielt.

Im Gesamtergebnis über alle Klone wurde die beste Bewurzelung nach Vermehrung in Honiggläsern festgestellt: 25%. Aber das Akklimatisierungsergebnis betrug nur 30% und war damit am schlechtesten. Nach Vermehrung in Weckgläsern betrug, ausgehend von Medium 87/27, die Bewurzelung 22% und die Akklimatisierung 43%. Ausgehend von Medium 87/6 betrug die Bewurzelung 12% und die Akklimatisierung 32%.

3.1.3.2. *Pyrus pyraaster*: Einfluss von IBA und NAA auf Bewurzelung und Akklimatisierung

Um den Einfluss der Auxine IBA und NAA auf die Bewurzelung und Abhärtung von *Pyrus pyraaster* zu prüfen, wurden die Medien 90/05 und 90/09 verwendet. Das Medium 90/05 enthielt 1 mg/l IBA. Das Medium 90/09 enthielt 0,5 mg/l IBA und 0,5 mg/l NAA. Es wurden Sprosse der Klone 320-4, 320-7 und 320-8 aus dem in Kapitel 3.1.1.1. beschriebenen Versuch eingesetzt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 18.

Tab. 18 Einfluss von IBA und NAA auf Bewurzelung und Akklimatisierung von *Pyrus pyraaster*

Medium 90/05: 1 mg/l IBA

Medium 90/09: 0,5 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA

xq = Mittelwert

Medium	Klon-nummer	Anzahl Mikrostecklinge	Anzahl bewurzelt	Prozent bewurzelt	Anzahl akklimatisiert	Prozent akklimatisiert
		gesamt	n	%	n	%
90/05	320-4	143	55	38	42	29
	320-7	13	2	15	3	23
	320-8	95	38	40	48	51
	Summe	251	95	38	93	37
90/09	320-4	137	40	29	28	20
	320-7	16	7	44	5	31
	320-8	96	58	60	66	69
	xq	249	105	42	99	40

Die geprüften Medien führten im Gesamtergebnis aller Klone zu Bewurzelungsraten von 38, bzw. 42% und zu Akklimatisierungsraten von 37, bzw. 40%. Von Klon 320-4 konnten in beiden Varianten weniger Pflanzen akklimatisiert werden als bewurzelt waren. Bei Klon 320-8 war es umgekehrt – in beiden Medien-Varianten wurden mehr Pflanzen akklimatisiert als bewurzelt waren. Bei Klon 320-7 konnte nach Medium 90/05 eine Pflanze mehr

akklimatisiert werden als bewurzelt waren, während nach Medium 90/09 2 Pflanzen weniger akklimatisiert wurden als bewurzelt waren.

3.1.3.3. *Pyrus pyraister*: Einfluss ausgewählter Faktoren auf Bewurzelung und Akklimatisierung

Modellhaft wurden unter Verwendung des Klons 320-8 folgende Faktoren in ihrer Wirkung auf Bewurzelung und Akklimatisierung geprüft:

Graphit im Bewurzelungsmedium

Absenkung der Bewurzelungstemperatur auf 20°/15°C

Länge des Mikrostecklings

Pikierttermin

Die Ergebnisse sind in Tabelle 19 dargestellt.

Tab. 19 Einfluss ausgewählter Faktoren auf die Akklimatisierung von *Pyrus pyraister*. Ergebnisse von Klon 320-8 mit 32 Mikrostecklingen je Variante.

lang = Länge des Mikrostecklings 1,5 bis 1,8 cm

kurz = Länge des Mikrostecklings 0,8 bis 1,0 cm

Medium 90/05: 1,0 mg/l IBA, 4 g/l Graphit

Medium 90/09: 0,5 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA, 4 g/l Graphit

Medium 90/08: 1,0 mg/l IBA, kein Graphit

n.e. = nicht erfasst

	Pikierttermin 5.5.00				Pikierttermin 28.6.00
	Bewurzelungs- temperatur 20°/15°C		Bewurzelungs- temperatur 24°/20°C		Bewurzelungs- temperatur 24°/20°C
Bewurze- lungs- medium	Länge des Mikrostecklings		Länge des Mikrostecklings		Länge des Mikrostecklings
	lang	kurz	lang	kurz	lang
90/05	70 %	77 %	50 %	52 %	0 %
90/09	82 %	71 %	64 %	78 %	0 %
90/08	n.e.	n.e.	88 %	n.e.	28 %

Wie die in Tabelle 19 aufgeführten Ergebnisse zeigen, ist dem Pikierttermin ein außerordentlich großer Einfluss zuzuschreiben. Beim Pikierttermin 5.5.00 ergaben sich Akklimatisierungsergebnisse zwischen 50% und 88%, während sie beim Pikierttermin 28.6.00 nur bei 0%, bzw. 28% lagen.

Graphit in den Bewurzelungsmedien verschlechterte beim ersten Pikierttermin die Akklimatisierungsrate gegenüber dem Vergleichsmedium 90/08 um 38 Prozentpunkte. Beim zweiten Pikierttermin überlebten nur Mikrostecklinge von dem Graphit-freien Medium, aber keine von den Graphit-haltigen Medien.

Die um ca. 5°C abgesenkte Bewurzelungstemperatur wirkte sich in drei der vier geprüften Varianten um 18 bis 25 Prozentpunkte erhöhend auf die Akklimatisierungsrate aus.

Die Prüfung des Einflusses der Länge der Mikrostecklinge ergab: Die kurzen Mikrostecklinge zeigten in drei Varianten um 2 bis 14 Prozentpunkte höhere Akklimatisierungserfolge als die langen. In einer Variante waren es 11 Prozentpunkte weniger.

3.1.3.4. *Sorbus torminalis*: Einfluss von Graphit auf Bewurzelung und Akklimatisierung

Es wurden die Bewurzelungsmedien 90/05 und 90/08 eingesetzt, die sich durch den Zusatz von 4 g/l Graphit in Medium 90/05 unterschieden. Es wurden fünf Klone der zur Verfügung gestellten in vitro Kulturen (vgl. Kap. 2.1.2.) verwendet mit 70 bis 182 Mikrostecklingen je Klon, die gleichmäßig auf beide Medien aufgeteilt wurden.

Die durchschnittlichen Akklimatisierungsraten der beiden Varianten lagen bei 42% für das Medium mit Graphit und 46% für das Medium ohne Graphit. Von den fünf geprüften Klonen reagierte nur Klon 76 positiv auf das Graphit im Medium mit 56% Akklimatisierung gegenüber 31% vom Medium ohne Graphit. Bei den Klonen 85, 146 und 283 wurde durch Graphit die Akklimatisierungsrate um 7 bis 11 Prozentpunkte verschlechtert. Der Klon 163 zeigte nach Bewurzelung auf Medium 90/05 mit Graphit um 23 Prozentpunkte erniedrigte Akklimatisierung (Tabelle 20).

Tab.20 Einfluss von Graphit im Bewurzelungsmedium auf die Akklimatisierung von *Sorbus torminalis*

Medium 90/05: 1,0 mg/l IBA, 4 g/l Graphit
 Medium 90/08: 1,0 mg/l IBA, kein Graphit
 xq = Mittelwert

Medium	Klon-nummer	Anzahl Mikrostecklinge	Anzahl bewurzelt	Prozent bewurzelt	Anzahl akklimatisiert	Prozent akklimatisiert
		gesamt	n	%	n	%
90/05	76	57	35	61	32	56
mit Graphit	85	91	36	40	36	36
	146	63	21	33	25	40
	163	35	18	51	7	20
	283	30	11	37	16	53
Summe		276	121		116	
xq				44		42
90/08	76	45	28	62	14	31
ohne Graphit	85	91	34	37	39	43
	146	64	23	36	31	48
	163	35	20	57	15	43
	283	44	18	41	28	64
Summe		279	123		127	
xq				44		46

3.1.4. Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf die in vitro Kultur

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des in Kap. 2.1.4. beschriebenen Versuchsplans dargestellt, die ohne Kryokonservierung erzielt wurden. Die Ergebnisse nach Kryokonservierung folgen in Kap. 3.2.. Ein Vergleich der Ergebnisse der Varianten ohne und mit Kryokonservierung wird in Kapitel 3.6. gezogen.

3.1.4.1. Kontaminationen

Bei Kulturbeginn wurden die Kontaminationen von mehreren Faktoren beeinflusst. Reiserlagerung und Genotyp wirkten sich bei allen drei Baumarten auf unterschiedliche Weise aus (Tabelle 21).

Tab. 21 Einfluss der Reiserlagerung auf die Kontaminationen bei *Pyrus pyraster*, *Sorbus torminalis* und *Prunus avium*

Lagerung der Reiser für 2 Monate bei +5°C im Kühlraum.

In Klammern: Anzahl Apices kontaminiert im Verhältnis zu Anzahl Apices präpariert.

xq = Mittelwert der Kontaminationen

Baumart	ohne Reiserlagerung	mit Reiserlagerung	xq
<i>Pyrus pyraster</i>	16% (88/540)	8% (43/537)	12%
<i>Sorbus torminalis</i>	32% (174/537)	31% (167/538)	32%
<i>Prunus avium</i>	13% (30/240)	32% (76/240)	22%

Bei Wildbirne wurde durch Lagerung das Kontaminationsergebnis halbiert, bei Elsbeere blieb es nahezu gleich und bei Vogelkirsche erhöhte es sich um das 2 1/2-fache (Tabelle 21).

Im Detail stellte sich dies so dar: Eventuell vorhandene jahresbedingte Unterschiede wurden durch die uneinheitlichen Reaktionen der einzelnen Klone überdeckt. Bei Wildbirne wies der Klon 95-14 immer weniger Kontaminationen auf als die beiden anderen Klone. Ohne Reiserlagerung waren es ungefähr halb so viele (9% gegenüber 19% und 20%). Nach Reiserlagerung war der Unterschied mit 6% gegenüber 7% und 11% nicht mehr so groß.

Auch bei Elsbeere wies ein Klon immer niedrigere Kontaminationsraten auf als die beiden anderen. Der Klon 126-3 lag mit 23% Kontaminationen sowohl ohne als auch mit Reiserlagerung immer um ungefähr die Hälfte, bzw. ein Drittel niedriger als die Klone 126-2 und 126-1.

Bei Vogelkirsche war es der Klon 247-4, der durch konstant niedrigere Kontaminationswerte auffiel. Hier wurden, in umgekehrter Weise wie bei Wildbirne, die Abstände durch die Reiserlagerung vergrößert. Vor der Lagerung (11%) unterschied er sich nur um 1, bzw. 2 Prozentpunkte. Nach der Lagerung hatte sich seine Kontaminationsrate um 8 Prozentpunkte erhöht, die des Klons 247-24 um 20 Prozentpunkte und die des Klons 247-28 um 30 Prozentpunkte.

3.1.4.2. Etablierung

3.1.4.2.1 Etablierungserfolg

Pyrus pyraaster

Bei *Pyrus pyraaster* beeinflusste der Erntetermin die Etablierung in zweifacher Hinsicht: Es zeigten sich Unterschiede sowohl zwischen den Monaten als auch zwischen den Jahren. Die jahresbedingten Differenzen waren so groß, dass sie getrennt betrachtet werden müssen (Abbildungen 2a und 2b).

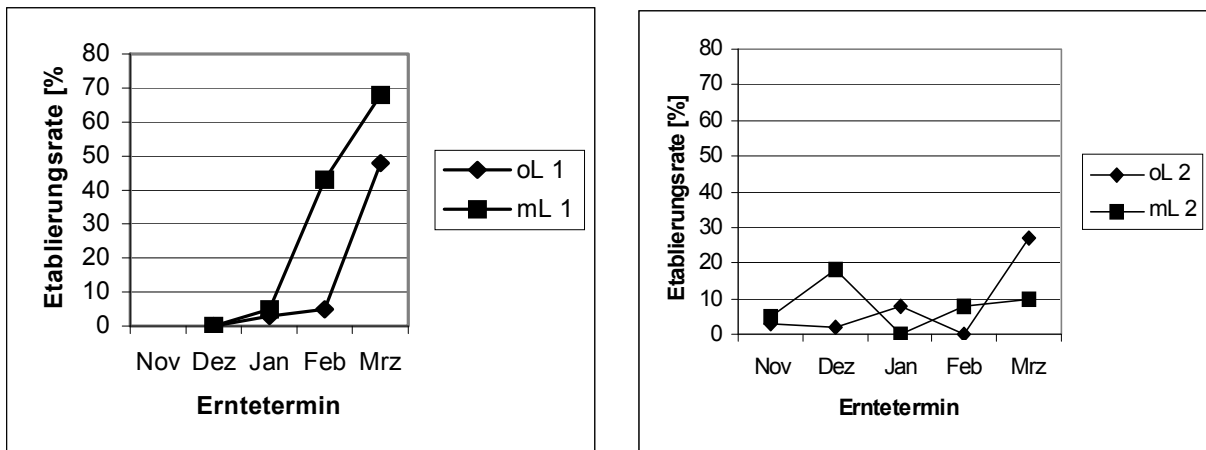


Abb. 2a und 2b Einfluss von Reiserlagerung und Reiserernte auf die Etablierungsraten von *Pyrus pyraaster*.

a: Reiserernte im Winter 1999/2000

b: Reiserernte im Winter 2000/2001

oL 1 = ohne Lagerung der Reiser im Winter 1999/2000

mL 1 = mit Lagerung der Reiser im Winter 1999/2000

oL 2 = ohne Lagerung der Reiser im Winter 2000/2001

mL 2 = mit Lagerung der Reiser im Winter 2000/2001

Im Jahr 1999/2000 zeigte sich zwischen Dezember und Februar ohne Lagerung eine leichte Zunahme der Etablierungsraten von 0% auf 5%. Im März erfolgte ein sprunghafter Anstieg auf 48%. Durch die Reiserlagerung wurden die Februar- und März-Ergebnisse deutlich erhöht. Im Februar betrug der Wert nach Lagerung 43%, ohne Lagerung waren es 5%. Dieser Steigerung um 37 Prozentpunkte folgte im März eine Steigerung um 20 Prozentpunkte von 48% auf 68%.

Im Winter 2000/2001 waren die durchschnittlichen Etablierungsraten mit 8% deutlich niedriger als im Vorjahr (21%). Die Trends waren nicht eindeutig, wie in Abbildung 2b zu sehen ist. Zwar war auch hier die höchste Etablierungsrate im März zu verzeichnen, aber sie lag mit 27% erheblich niedriger als im Vorjahr. Der Einfluss der Reiserlagerung verbesserte die Werte im Dezember und im Februar, nicht in den anderen Monaten. Das Ausmaß der Verbesserung war erheblich niedriger als im Vorjahr.

Von den Klonen waren sich 95-12 und 95-14 ähnlich in der Reaktion auf die verschiedenen Erntetermine. Wie in Abbildung 3 dargestellt, ähnelt sich bei diesen Klonen der prozentuale Anteil der einzelnen Erntetermine an der Gesamtprossbildungskapazität sehr, wobei eine

deutliche monatliche Zunahme von Dezember bis März zu verzeichnen ist. Der Klon 95-1 zeigte die ebenfalls die meisten Etablierungen im März, aber nur wenige im Februar und keine im Januar. In November und Dezember lagen seine Etablierungswerte deutlich über denen der beiden anderen Klone.

In der Gesamtabtablishung lagen die Klone 95-12 und 95-14 mit 24% und 19% dicht beieinander, während sie bei Klon 95-1 nur 9% betrug.

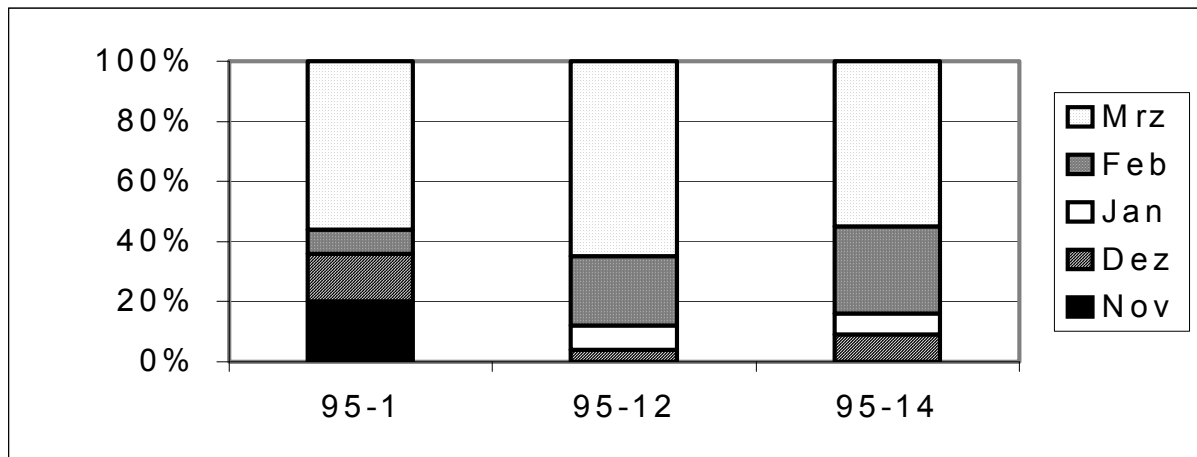


Abb. 3 Prozentualer Anteil der einzelnen Erntetermine an der Gesamtmenge etablierter Apices der einzelnen Klone von *Pyrus pyraeaster*

Legende: Erntetermine der Reiser

Sorbus torminalis

Die Etablierung wurde sowohl durch den Reisererntetermin als auch durch die Reiserlagerung beeinflusst. Zwischen den beiden Jahren gab es einige Unterschiede, die zum Teil nur zeitliche Verschiebungen waren (Tab. 22). Um Tendenzen aufzuzeigen, wurden Mittelwerte aus beiden Erntejahren gebildet (Abb. 4).

Tab. 22 Einfluss von Reiserlagerung und Reiserernte auf die Etablierungsraten von *Sorbus torminalis* in den Jahren 1999/2000 und 2000/2001. Mittelwerte der Ergebnisse mit 3 Klonen.

oL = ohne Lagerung der Reiser

mL = mit Lagerung der Reiser

n.e. = nicht erfasst

Erntetermin	Erntejahr 1999/2000		Erntejahr 2000/2001	
	oL	mL	oL	mL
November	n.e.	n.e.	5 %	48 %
Dezember	2 %	15 %	23 %	50 %
Januar	10 %	42 %	27 %	15 %
Februar	4 %	3 %	10 %	5 %
März	48 %	43 %	15 %	5 %

Die Etablierungsraten ohne Reiserlagerung lagen von November bis Februar unter 18%, und es war ein Anstieg auf 32% im März zu verzeichnen (Abb. 4). Nach Reiserlagerung waren die Etablierungsraten in November, Dezember und Januar höher und in Februar und März niedriger als ohne Lagerung. Die Unterschiede waren im November am größten und nahmen zum Februar hin ab. Die Verbesserung der Etablierungsraten wurde in der ersten Hälfte des Winters nach Lagerung festgestellt, ohne Lagerung im März (Tabelle 22).

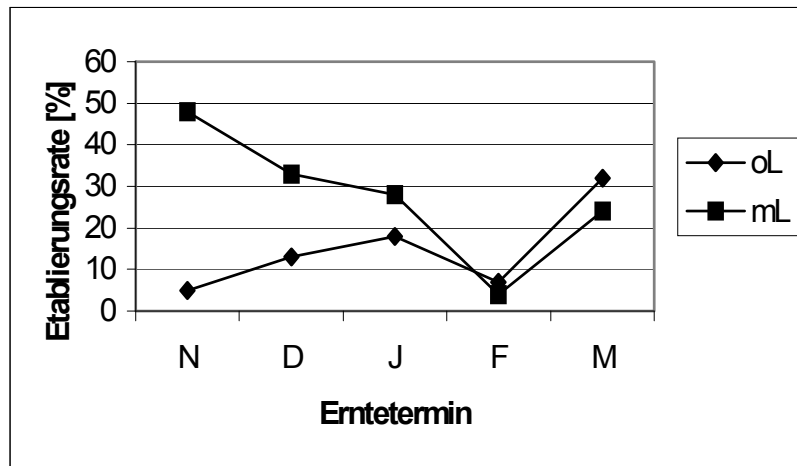


Abb. 4 Einfluss von Reiserlagerung und Reiserernte auf die Etablierungsraten von *Sorbus torminalis*. Mittelwerte der Ergebnisse mit 3 Klonen aus den Jahren 1999/2000 und 2000/2001.

Legende: oL = ohne Lagerung der Reiser; mL = mit Lagerung der Reiser
 Erntetermine: N = November, D = Dezember, J = Januar, F = Februar, M = März

Abbildung 5a verdeutlicht für jeden Klon das Ausmaß der Differenz zwischen gelagerten und ungelagerten Reisern zu den einzelnen Ernteterminen. Eine positive Auswirkung der Lagerung ergab einen positiven D (etab)-Wert, eine negative Auswirkung der Lagerung ergab einen negativen D (etab)-Wert. Bei Klon 126-3 war der D (etab)-Wert fast gleichmäßig fallend von November bis März. In November und Dezember war er am stärksten von den drei Klonen positiv beeinflusst worden. Bei Klon 126-1 fiel auf, dass er sich im Dezember fast gar nicht positiv beeinflussen ließ (D (etab) betrug +2) und im März besonders stark negativ (D (etab) betrug -11) auf die Lagerung reagierte. Klon 126-2 war der einzige Klon, bei dem ein negativer Effekt durch die Lagerung bereits im Januar auftrat. Aber in Februar und März zeigte er die geringste negative Reaktion.

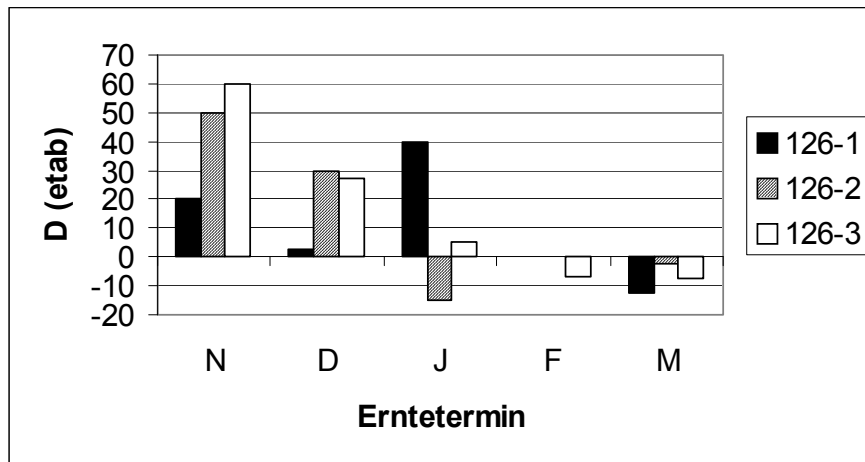


Abb. 5a Differenz zwischen den Etablierungsraten gelagerter und ungelagerter Reiser in Abhängigkeit vom Erntetermin bei *Sorbus torminalis*. Einzelergebnisse mit den drei Klonen 126-1, 126-2, 126-3..

D (etab) = Differenz zwischen Etablierungsrate mit Reiserlagerung und ohne Reiserlagerung
 Legende: Nummern der in diesem Versuch verwendeten Klone
 Erntetermine: N = November, D = Dezember, J = Januar, F = Februar, M = März

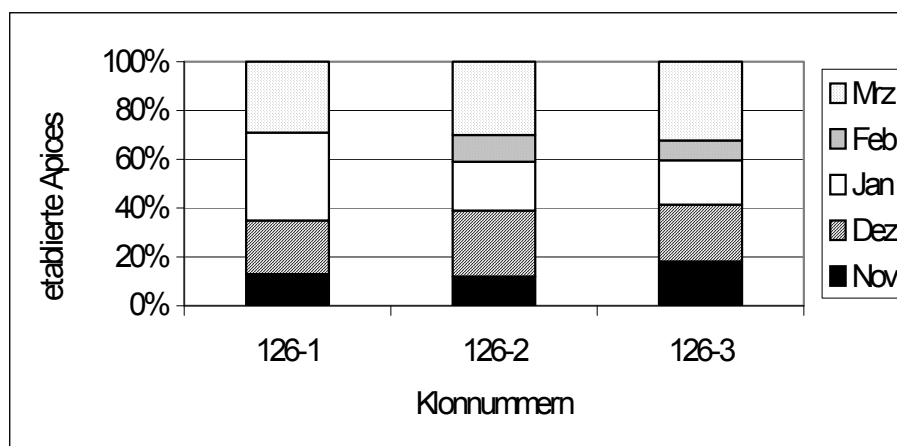


Abb. 5b Prozentualer Anteil der einzelnen Erntetermine an der Gesamtmenge etablierter Apices der einzelnen Klone von *Sorbus torminalis*

Legende: Erntetermine der Reiser

Die genotypspezifische Reaktion auf die Erntetermine zeigt Abbildung 5b. Die Klone 126-2 und 126-3 waren sich ähnlich indem beide die höchsten Etablierungsraten in März aufwiesen und die niedrigsten im Februar. Bei Klon 126-1 war der prozentuale Anteil etablierter Apices im Januar deutlich höher als März. Im Februar gelangten keine Apices zur Etablierung. Insgesamt sind die Unterschiede durch den Jahresgang nicht so stark ausgeprägt wie bei Wildbirne.

In der Gesamtabtabelle lagen die Klone 126-1 und 126-2 mit 28%, bzw. 29% sehr dicht beieinander, während Klon 126-3 mit 23% niedriger lag.

Prunus avium

Erntedatum und Reiserlagerung beeinflussten die Etablierung von *Prunus avium* nicht so stark wie bei den anderen Baumarten. Prinzipiell war eine Etablierung immer möglich. Die besten Etablierungsraten wurden im Dezember erzielt (63%), wobei der Unterschied zum schlechtesten Termin Februar 16 Prozentpunkte betrug. Die Reiserlagerung hatte nur im Dezember eine positive Wirkung auf die Etablierungsrate, wie aus Abbildung 6 zu ersehen ist. An den drei anderen Terminen trat nach Reiserlagerung eine um 12 bis 46 Prozentpunkte niedrigere Sprossbildung ein.

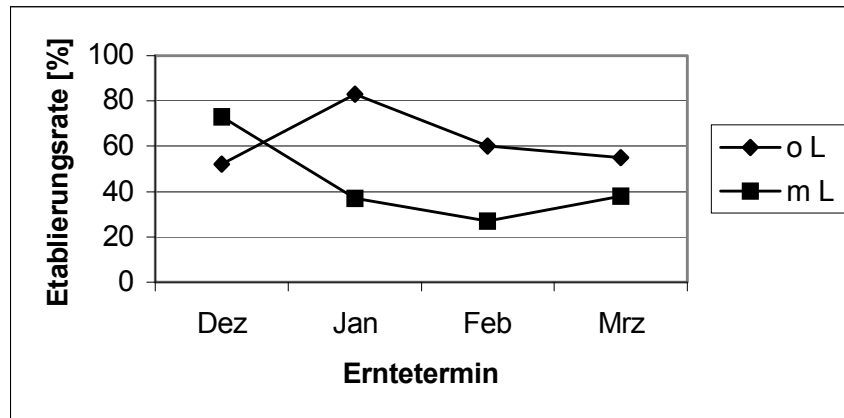


Abb. 6 Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Etablierungsraten von *Prunus avium*. Mittelwerte der Ergebnisse mit 3 Klonen.

oL = ohne Lagerung der Reiser
mL = mit Lagerung der Reiser

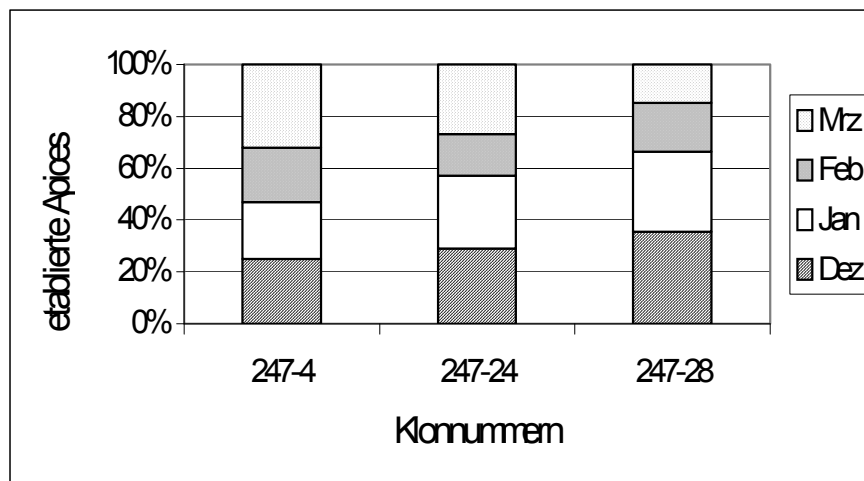


Abb. 7 Prozentualer Anteil der einzelnen Erntetermine an der Gesamtmenge etablierter Apices der einzelnen Klone von *Prunus avium*

Legende: Erntetermine der Reiser

Die genotypspezifische Reaktion auf die Erntetermine zeigt Abbildung 7. Alle Klone wiesen im Februar niedrige Etablierungsraten auf. Bei Klon 247-4 ergab der Erntetermin März die höchsten Etablierungsraten, während dies bei Klon 247-28 im Dezember der Fall war. Klon 247-24 zeigte zwischen Dezember, Januar und März kaum Unterschiede. Insgesamt sind die Unterschiede durch den Jahresgang nicht so stark ausgeprägt wie bei Wildbirne.

Die Gesamtablierungsrate war bei Klon 247-24 mit 61% am höchsten. Klon 247-4 wies 51% auf und bei Klon 247-28 betrug sie 47%. Damit liegen die Etablierungsraten bei Wildkirsche trotz der durch die Reiserlagerung verursachten hohen Kontaminationsraten (siehe Anfang des Kapitels) deutlich höher als bei Elsbeere und Wildbirne.

3.1.4.2.2 Etablierungsdauer

Unter Etablierungsdauer wird hier der Zeitraum zwischen Präparation der Knospen und Beginn der Vermehrung, erkennbar am Anstieg der Vermehrungskoeffizienten, verstanden. Dieser Zeitpunkt war bei Elsbeere nicht immer ganz eindeutig. Manchmal begannen Knospen zwar mit der Sprossbildung und setzten sie über mehrere Subkulturen fort, verbräunten aber später ohne erkennbaren Grund. Solche Knospen wurden nicht als „etabliert“ bewertet und auch bei der Feststellung der Etablierungsdauer nicht berücksichtigt. Andere Knospen zeigten eine kurzfristige Vermehrungsphase über 1, 2 oder 3 Subkulturen und blieben dann für mehrere Monate ohne weiteres Wachstum und ohne Absterbeerscheinungen. Diese Knospen galten als etabliert und wurden berücksichtigt.

Bei allen drei Baumarten wurde die Etablierungsdauer von Reisererntetermin und Reiserlagerung beeinflusst. Dies wird im Folgenden beschrieben. Eine Übersicht gibt Tabelle 23.

Pyrus pyraaster

Alle drei Klone zeigten die kürzeste Etablierungsdauer ohne Lagerung bei Reiserernte im Januar (Durchschnitt: 18 Wochen). Der Klon 95-12 war hier mit 12 Wochen der schnellste, während die beiden anderen Klone 21 Wochen benötigten. Die zweimonatige Reiserlagerung nach Ernte im März führte zu einer Verkürzung der durchschnittlichen Etablierungsdauer auf 13 Wochen. Im Vergleich dazu betrugen die längste Etablierungszeit 24 Wochen (Klon 95-14 im Februar ohne Reiserlagerung).

Auch hier, wie bei den anderen betrachteten Parametern, waren die Reaktionen genotypspezifisch unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Differenz zwischen dem Wert „März ohne Lagerung“ zu dem Wert „März mit Lagerung“ betrug nur 2 Wochen bei Klon 95-12, 3 Wochen bei dem Klon 95-1 und 11 Wochen bei dem Klon 95-14.

Sorbus torminalis

Die Etablierungsdauer betrug ohne Lagerung zwischen 21 und 29 Wochen, mit Lagerung zwischen 17 und 22 Wochen (Tabelle 23). Sie wurde also durch Lagerung verkürzt. Der jeweils niedrigste Wert wurde bei Ernte im März erreicht. Die genotypischen Unterschiede waren zum Teil beträchtlich, ebenso die Unterschiede zwischen den beiden Erntejahren. Darauf soll aber nicht näher eingegangen werden, da bei Elsbeere auf Grund der niedrigen Etablierungsraten nur wenige Daten vorliegen (vgl. Tabelle 23).

Prunus avium

Die Etablierungsdauer der Vogelkirschen wurde durch den Reisererntetermin beeinflusst, aber nur wenig durch die Reiserlagerung. Anders als bei den beiden anderen Baumarten war ohne Lagerung nicht März sondern Februar der Erntetermin, der mit 14 Wochen zu den kürzesten Etablierungszeiten führte. Im Januar und März waren es 18 Wochen, und der Dezember erwies sich mit 22 Wochen als der schlechteste Monat. Die drei Genotypen wiesen alle exakt dieselben Werte auf (Abbildung 8).

Bemerkenswert war der Einfluss der Reiserlagerung insofern, als er fast immer zu einer Etablierungsdauer von 15 Wochen führte – unabhängig von Ernteterminen und Genotypen. Hiervon gab es nur zwei Ausnahmen: Beim Klon 247-28 verbräunten beim Erntetermin März mit Lagerung alle Knospen und starben ab. Der Klon 247-4 reagierte auf die Reiserlagerung

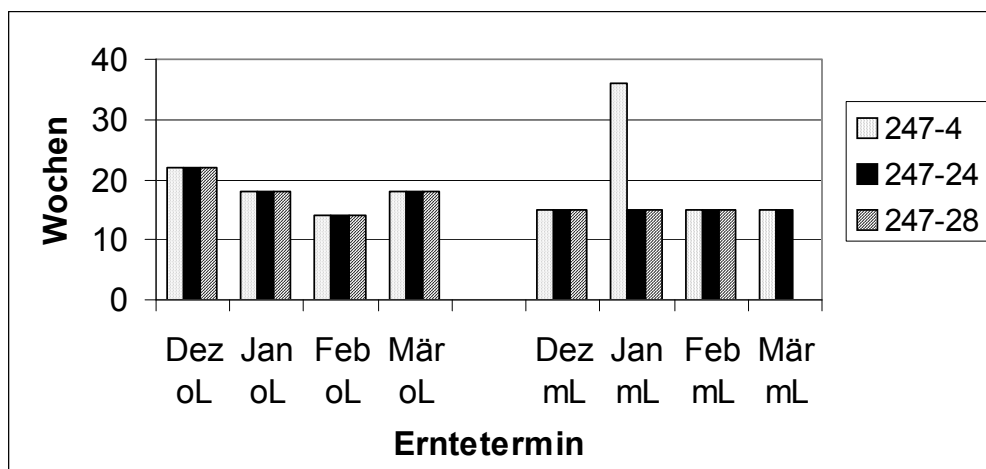


Abb. 8 Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Etablierungsdauer (in Wochen) bei *Prunus avium*.

oL = ohne Lagerung der Reiser

mL = mit Lagerung der Reiser

Legende: Nummern der in diesem Versuch verwendeten Klone

bei Ernte im Januar mit einer verzögerten Etablierungsdauer von 36 Wochen. Bedingt durch diese Ausnahmereaktion lagen die Durchschnittswerte der Klone nach Lagerung um 5 Wochen auseinander (Klone 247-24 und 247-28: 15 Wochen, Klon 247-4: 20 Wochen), während sie ohne Lagerung einheitlich 18 Wochen betrugen.

3.1.4.3. Vermehrungskoeffizienten

Im Folgenden werden die mittleren Vermehrungskoeffizienten der ersten vier (*Pyrus pyrastrer*), bzw. drei (*Prunus avium*) Transfers ab Beginn der Vermehrungsphase betrachtet. Es liegen die Werte des Winters 1999/2000 zugrunde. Die Vermehrungskoeffizienten veränderten sich mit den Reiserernteterminen und der Reiserlagerung bei jeder Baumart unterschiedlich. Dies ist in den Abbildungen 9a und b illustriert. Wildbirne und Vogelkirsche war gemeinsam, dass dem Kulturbeginn Januar die höchsten Vermehrungskoeffizienten folgten (bei Vogelkirsche nur ohne Lagerung der Reiser). Danach wurde ein fast

kontinuierliches Absinken der Vermehrungskoeffizienten im Februar und im März festgestellt. Durch die Reiserlagerung wurden bei Wildbirne alle Werte erniedrigt, und zwar im Januar am wenigsten (um 0,2) und fortschreitend im März am meisten (um 0,6). Bei Vogelkirsche fand eine negative Beeinflussung durch Reiserlagerung nur bei den Ernteterminen Dezember und Januar statt. Im Februar waren die Werte gleich und nach Reiserernte im März deutlich erhöht (3,4 mit Reiserlagerung, 1,9 ohne Reiserlagerung).

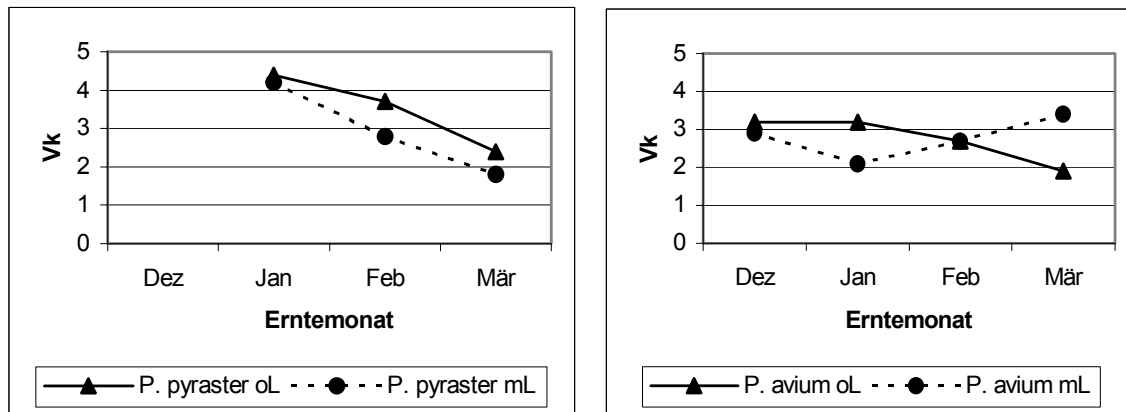


Abb. 9a und 9b Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyraeaster* und *Prunus avium*. Ergebnisse mit je 3 Klonen.

Vk = Vermehrungskoeffizienten (Durchschnitt der ersten 4 (*Pyrus pyraeaster*), bzw. 3 (*Prunus avium*) Vermehrungskoeffizienten ab Beginn der Vermehrungsphase)

oL = ohne Lagerung der Reiser

mL = mit Lagerung der Reiser

Für *Sorbus torminalis* lagen nicht genügend Werte vor, um den Einfluss von Erntetermin und Reiserlagerung zu prüfen, da sehr häufig ohne Lagerung gar keine Sprossbildung erfolgt war (vgl. Kap. 3.1.4.2.1). Es konnte daher nur unter Bildung des Mittelwertes aller vorhandenen Ergebnisse jedes Erntetermins der Einfluss des Erntetermins dargestellt werden. Die Vermehrungskoeffizienten betrugen bei Ernte im Dezember durchschnittlich 1,2, im Januar 1,3 und im März ebenfalls 1,3. Hieraus kann kein Trend abgeleitet werden. Möglicherweise wurden die Vermehrungskoeffizienten von *Sorbus torminalis* nicht oder nur unwesentlich durch den Erntetermin beeinflusst.

3.1.4.4. Auswirkung der Einflüsse von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Pflanzenproduktion

In Tabelle 23 sind die in den vergangenen Kapiteln geschilderten Ergebnisse aus allen Varianten und für alle Baumarten zusammengestellt. Auf welche Weise sich diese Daten in der Produktion größerer Stückzahlen auswirken, ist in Abbildung 10 beispielhaft für *Pyrus pyraeaster* illustriert. Sie zeigt die Entwicklung der Stückzahlen ab dem Termin der Reiserernte (Zeitpunkt Woche 0), sowie die Anzahl durchzuführender Transfers: Jeder Datenpunkt entspricht einem Transfer. Ausgehend von 100 Ausgangsexplantaten sinkt die Stückzahl

zunächst auf Grund von Ausfällen durch Kontaminationen oder Absterben entsprechend der Etablierungsrate. Entsprechend der Etablierungsdauer verbleibt die Kurve auf dem niedrigen Niveau, bis sie mit dem Einsetzen der Vermehrungsphase anzusteigen beginnt. Der Anstieg erfolgt entsprechend dem Durchschnitt der Vermehrungskoeffizienten der ersten vier (*Pyrus pyraaster*), bzw. drei (*Prunus avium*) Transfers. So ist aus der Abbildung ersichtlich, wie Reisererntetermin und Reiserlagerung die Produktion bestimmter Stückzahlen, den Zeitbedarf und den Arbeitsaufwand (Anzahl Transfers) beeinflussen.

Tab. 23 Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Etablierungsrate, Etablierungsdauer und Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyraaster*, *Prunus avium* und *Sorbus torminalis*

oL = ohne Lagerung der Reiser

mL = mit Lagerung der Reiser

* Vermehrungskoeffizient: Durchschnitt der ersten 4 (*Pyrus pyraaster*), bzw. 3 (*Prunus avium*) Transfers der Vermehrungsphase

Baumart	Etablierungsrate [%]	Etablierungsdauer [Wochen]	Vermehrungs- koeffizient *
Reisererntetermin und Behandlung			
<i>Pyrus pyraaster</i>			
Dezember oL	0	-	-
Januar oL	3	18	4,4
Februar oL	5	22	3,7
März oL	48	21	2,4
Dezember mL	0	-	-
Januar mL	5	22	4,2
Februar mL	43	19	2,8
März mL	68	13	1,8
<i>Prunus avium</i>			
Dezember oL	52	22	3,2
Januar oL	83	18	3,1
Februar oL	60	14	2,7
März oL	55	18	1,9
Dezember mL	73	15	2,9
Januar mL	37	22	2,1
Februar mL	27	15	2,7
März mL	38	15	3,4
<i>Sorbus torminalis</i>			
Dezember oL	13	25	
Januar oL	18	29	
Februar oL	7	24	
März oL	32	21	
Dezember mL	33	22	
Januar mL	28	18	
Februar mL	4	22	
März mL	24	17	

Dies sei an einem Beispiel erläutert. Eine Stückzahl von 1000 Sprossen ist bei Reiserernte im Februar mit Lagerung nach 26 Wochen und 5 Transfers erreicht. Dieselbe Stückzahl ist bei Ernte im März ohne Lagerung erst 34 Wochen nach der Ernte und mit fast dem doppelten Arbeitsaufwand von 9 Transfers erreicht.

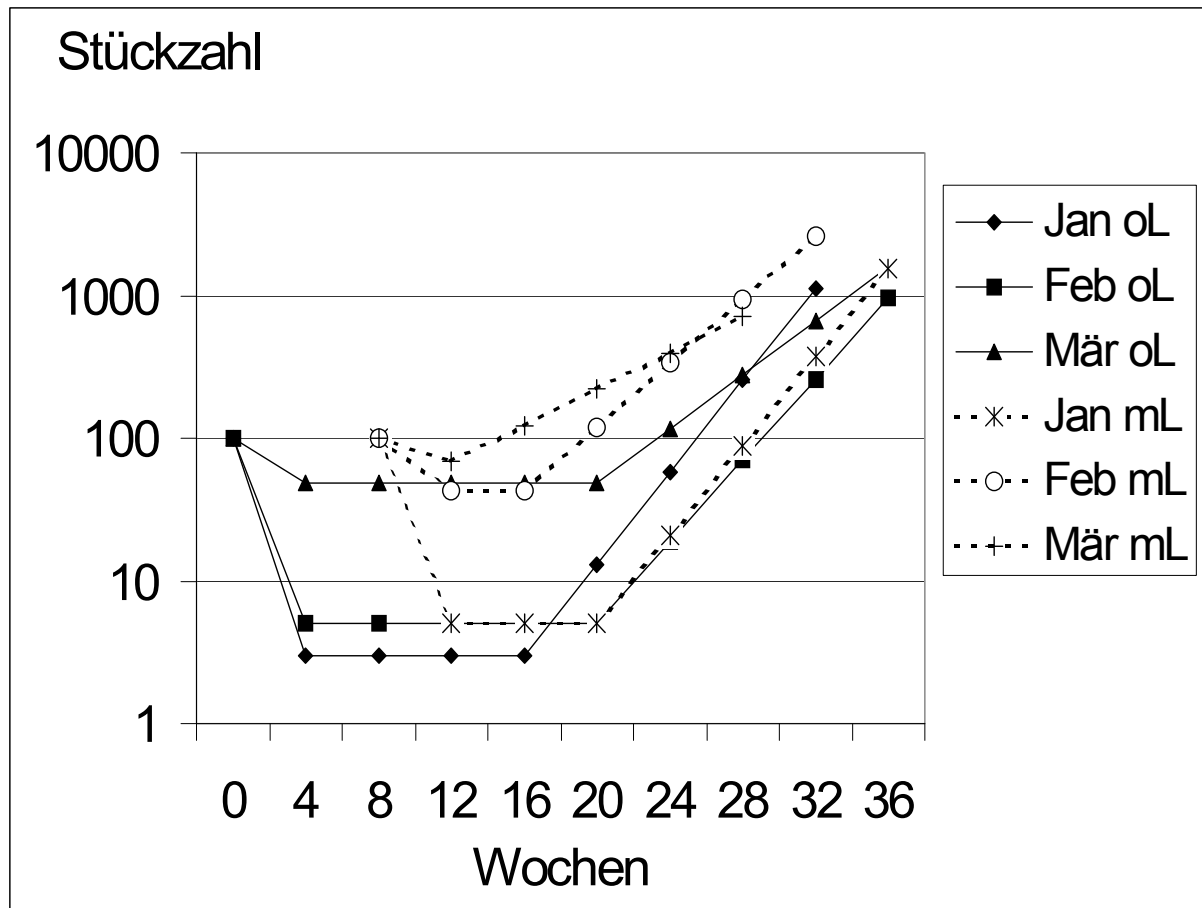


Abb. 10 Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf die Stückzahlen von in vitro Pflanzen bei *Pyrus pyrastra*, ausgehend von 100 eingesetzten Winterknospen je Variante zum Zeitpunkt Woche 0.

Entwicklung der Stückzahlen ab dem Termin der Reiserernte (Zeitpunkt Woche 0) und Anzahl durchzuführender Transfers: Jeder Datenpunkt entspricht einem Transfer. Rechnerisches Ergebnis aus den Daten der Tabelle 23 für Etablierungsrate, Etablierungsdauer und Vermehrungskoeffizienten.

Legende: Reisererntetermine, oL = ohne Lagerung der Reiser, mL = mit Lagerung der Reiser

3.2. Ergebnisse der Kryokonservierung

3.2.1. Kryokonservierung von in vitro Material

3.2.1.1. Einkapselung in Alginatkugeln und Trocknung

Es wurden die verschiedenen Trocknungsmöglichkeiten von Alginatkugeln ohne eingebettetes Pflanzenmaterial untersucht und Trocknungs-Eichkurven erstellt. Für die in den folgenden Versuchen verwendete Methode des Trocknens im Exsiccator wurde die Eichkurve mit Alginatkugeln, in die Apices eingebettet waren, überprüft. Daran schlossen sich Versuche mit verschiedenen Etablierungsmedien als Basis für die Alginat-Einbettung an. Es folgten Versuche zum Einfluss des Trocknens der Alginatkapseln und zum Einfluss der Kälteakklimatisierung auf das Wachstum der Apices, bevor in Alginatkugeln eingebettete Apices erstmalig in Flüssigstickstoff eingefroren wurden.

3.2.1.1.1 Trocknungsmethoden

Für die 3 Trocknungsmethoden „Exsiccator“, „Silicagel direkt“ und „Luftstrom“ (vgl. Kapitel 2.6.5.2. Material und Methoden) wurden Eichkurven erstellt. Abbildung 11 zeigt die Eichkurven. Auffallend sind die Unterschiede in der Trocknungsgeschwindigkeit zwischen der Methode Exsiccator und den beiden anderen Methoden.

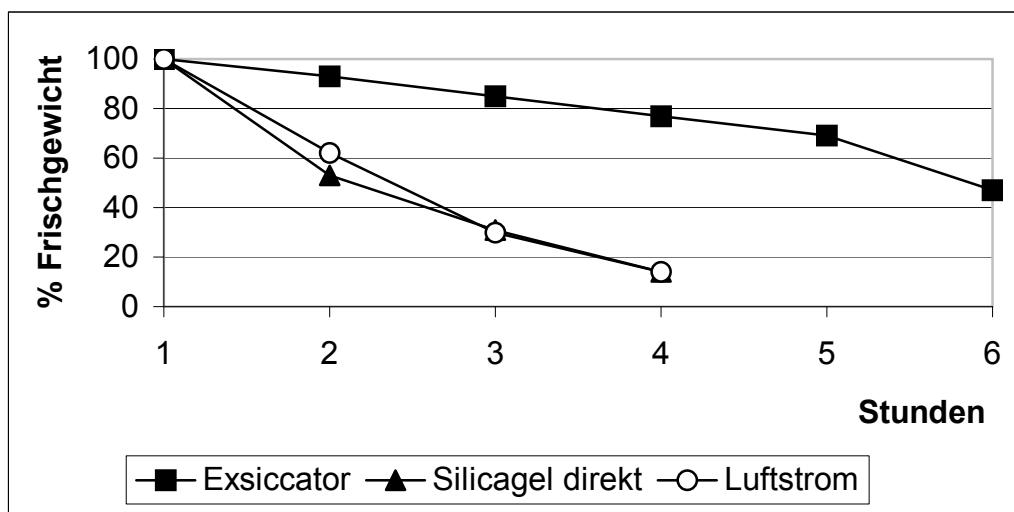


Abb. 11 Eichkurven von 3 Trocknungsmethoden für Alginatkugeln

Legende: Trocknungsmethoden

Methode Exsiccator: offene Petrischalen mit Alginatkugeln befinden sich auf einer perforierten Keramikscheibe über Silicagel in einem Exsiccator.

Methode Silicagel direkt: Alginatkugeln liegen auf Filterpapier direkt auf Silicagel.

Methode Luftstrom: Alginatkugeln liegen in offenen Petrischalen im Luftstrom der sterilen Werkbank. Bei allen Methoden wurden je 10 Alginatkugeln mit 6 Wiederholungen eingesetzt.

Die Trocknung von Alginatkugeln im Luftstrom der Werkbank (Methode „Luftstrom“) und auf Silicagel (Methode „Silicagel direkt“) wurde von kleinen Unterschieden in der Größe und

Form der Alginatkugeln beeinflusst. Beim Trocknen im Luftstrom spielte zusätzlich die Position der Alginatkugeln in der Petrischale eine Rolle: Kugeln, die auf der Quelle des Luftstroms zugewandten Seite lagen, trockneten schneller. So betrugen nach einer Stunde Trocknung im Luftstrom die Einzelwerte zwischen 67% und 83 % des Frischgewichts (FG) bei 6 Wiederholungen. Beim Trocknen im Exsiccator wurden wesentlich stabilere Werte erzielt: Nach einer Stunde Trocknungszeit lag das Gewicht zwischen 92% und 94% des FG bei 6 Wiederholungen. Der Trocknungsprozess war langsamer und weniger störanfällig. Daher wurde im Folgenden nur noch die Methode „Exsiccator“ angewendet.

Das Trocknungsverhalten der Alginatkugeln änderte sich, wenn Apices eingebettet waren. Tabelle 24 zeigt die Werte für einen Versuch mit Elsbeeren- und zwei Versuche mit Wildbirnen-Apices.

Tab. 24 Trocknung von Alginatkugeln mit Apices von Wildbirne und Elsbeere nach der Methode „Exsiccator“: Mittelwerte der Ergebnisse von je 10 Kugeln in 6 Wiederholungen im Vergleich mit den Werten der Eichkurve. Angaben in Prozent des Frischgewichts (% FG)

n.e. = nicht erfasst

Trocknungszeit [Stunden]	1	2	3	4	6	16
Wildbirne	91	87	n.e.	75	-	-
Wildbirne	-	-	-	57	35	25
Elsbeere	-	85	n.e.	69	47	-
Eichkurve Exsiccator	93	85	77	69	47	-

Die Werte von Elsbeere unterschieden sich nicht von denen der Eichkurve. Die Unterschiede der Wildbirne beim 4- und 6-Stunden-Wert könnten mit der Größe der Apices zusammenhängen. Daher wurde bei den folgenden Versuchen nicht die Trocknungszeit anhand der Eichkurve festgelegt, sondern Gewichtskontrollen durchgeführt, um den genauen Trocknungsgrad festzustellen.

3.2.1.1.2 Effekte von Einkapselung, Nährmedien und Apexgröße

Bei Wildbirne wurde je ein gut und ein schlecht regenerierender Klon ausgewählt (Klone 59-2 und 439-28), bei Elsbeere zwei gut regenerierende (Klone 85 und 98) und ein schlecht regenerierender (Klon 283). Als Medien wurden für Wildbirne 2/8, 87/29 und 87/39 eingesetzt und für Elsbeere 2/11, 87/29 und 87/39. Die Apices wurden im Hinblick auf die anstehende Kryokonservierung kleiner als in vorangegangenen Versuchen präpariert und maßen ca. 0,5 mm in jeder Richtung. Von jeder Variante wurden 30 eingekapselte und 30 nicht eingekapselte Explantate in Petrischalen auf das jeweilige Medium aufgesetzt. Die Apices zeigten jedoch kein Wachstum. Eingekapselte Apices starben schneller ab als nicht eingekapselte. Auf den Medien 87/37 (Wildbirne) und 2/11 (Elsbeere) blieben die Explantate länger grün als auf den anderen Medien.

In diesem Versuch war die Mindestgröße der Apices unterschritten worden. Daher wurden in den folgenden Versuchen die Apices immer in einer Größe von ca. 1 mm³ präpariert.

3.2.1.1.3 Effekte von Kältebehandlung, Einkapselung und Trocknung *Pyrus pyraeaster*

Von den Klonen 59-2 und 439-28 wurden Sprosse bei 24°C, 10°C und 4°C für jeweils 2, bzw. 4 Wochen kälteakklimatisiert. Von diesen Sprosskulturen wurden die Apices präpariert und in Alginat eingekapselt. Die Hälfte der eingekapselten Apices der 4-wöchigen Kälteakklimatisierung wurden auf 61% des Frischgewichts (+/- 3%) im Exsiccator getrocknet. Pro Variante wurden zwischen 15 und 20 Explantate verwendet, je nach vorhandener Materialmenge. Die Explantate wurden auf das Medium 87/37 aufgesetzt und nach 4 bis 5 Wochen bonitiert. Bei der Bonitur wurde die Blattentfaltung nach „beginnend“ und „1 Blatt oder mehr (vollständig entfaltet)“ unterschieden. Die Tabelle 25 gibt die Prozentzahlen der Bonitur an.

Tab. 25 Einfluss von Kältebehandlung, Einkapselung und Trocknung auf die Blattentfaltung von Apices von *Pyrus pyraeaster*: Mittelwerte der Klone 59-2 und 439-28.

Die Bonitur der Blattentfaltung erfolgte 4 – 5 Wochen nach der Präparation der Apices. Danach wurde der Versuch abgebrochen. Eine Aussage über Sprosswachstum ist nicht möglich.

Kältebehandlung		Behandlung der Apices	Blattentfaltung (% der Explantate)		
Temperatur	Dauer		keine	beginnend	1 Blatt o. mehr
24 °C	2 Wochen	Kontrolle	30	55	15
		eingekapselt	60	40	0
	4 Wochen	Kontrolle	60	27	13
		eingekapselt	83	17	0
		getrocknet	100	0	0
10°C	2 Wochen	Kontrolle	65	18	18
		eingekapselt	75	23	3
	4 Wochen	Kontrolle	63	27	10
		eingekapselt	67	27	7
		getrocknet	50	50	0
4°C	2 Wochen	Kontrolle	65	25	10
		eingekapselt	80	20	0
	4 Wochen	Kontrolle	53	27	20
		eingekapselt	70	27	3
		getrocknet	90	10	0

Die Kältebehandlung führte teilweise zu einer Förderung der Blattentfaltung. Das beste Ergebnis wurde ohne Vorkühlung bei der Kontrolle nach zwei Wochen bei 24°C bonitiert. Eingekapselte Apices zeigten weniger Blattentfaltung als nicht eingekapselte. Durch Trocknen wurde die Entfaltung der Blätter verzögert oder, wie in der Variante 24°C für 4 Wochen, völlig verhindert. Bei keiner der Varianten mit Trocknung waren bei der Bonitur voll entwickelte Blätter vorhanden. Die geringste Behinderung der Blattentfaltung nach Einkapselung und Trocknung trat in der Variante „10°C für 4 Wochen“ auf.

Sorbus torminalis

Mit *Sorbus torminalis* konnte der oben geschilderte Versuch in größerem Umfang durchgeführt werden, da mehr Material zur Verfügung stand. Von den Klonen 85, 98 und 283 wurden Sprosse bei 24°C, 10°C und 4°C für jeweils 2, 4 und 8 Wochen kältebehandelt. Danach wurden die Apices präpariert, in Alginat eingekapselt und auf ca. 60% des Frischgewichts (+/- 6%) im Exsiccator getrocknet. Pro Variante wurden 10 Apices, in einigen Fällen auch 20, je nach vorhandener Materialmenge, verwendet. Die Explantate wurden auf das Medium 2/11 aufgesetzt und nach 4 bis 5 Wochen bonitiert. Bei der Bonitur wurde wie bei Wildbirne die Blattentfaltung nach „beginnend“ und „1 Blatt oder mehr“ unterschieden (Tabelle 26).

Tab. 26 Einfluss von Kältebehandlung, Einkapselung und Trocknung auf die Blattentfaltung von Apices von *Sorbus torminalis*. Mittelwerte der Klone 85, 98, 283.

Die Bonitur der Blattentfaltung erfolgte 4 – 5 Wochen nach der Präparation der Apices. Danach wurde der Versuch abgebrochen. Eine Aussage über Sprosswachstum ist nicht möglich.

Kältebehandlung		Behandlung der Apices	Blattentfaltung (% der Explantate)		
Temperatur	Dauer		keine	beginnend	1 Blatt o. mehr
24 °C	2 Wochen	Kontrolle	60	38	3
		eingekapselt	72	23	5
		getrocknet	70	30	0
	4 Wochen	Kontrolle	75	5	20
		eingekapselt	75	25	0
		getrocknet	80	20	0
	8 Wochen	Kontrolle	70	30	0
		eingekapselt	90	10	0
		getrocknet	100	0	0
10°C	2 Wochen	Kontrolle	45	40	15
		eingekapselt	68	30	2
		getrocknet	70	30	0
	4 Wochen	Kontrolle	60	25	15
		eingekapselt	75	20	5
		getrocknet	80	20	0
	8 Wochen	Kontrolle	65	25	10
		eingekapselt	50	50	0
		getrocknet	95	5	0
4°C	2 Wochen	Kontrolle	45	50	5
		eingekapselt	70	28	2
		getrocknet	80	20	0
	4 Wochen	Kontrolle	45	35	20
		eingekapselt	40	30	30
		getrocknet	30	40	30
	8 Wochen	Kontrolle	40	25	35
		eingekapselt	80	20	0
		getrocknet	55	45	0

Im Gegensatz zu Wildbirne führte das Einkapseln bei Elsbeere nicht grundsätzlich zu einer Behinderung des Wachstums. Besonders herausragend ist die Variante „4°C für 4 Wochen“, bei der die eingekapselten und getrockneten Apices besseres Wachstum zeigten als die ungetrockneten und die Kontrolle. Die Kältebehandlung förderte die Toleranz für Einkapseln und Trocknen. Die schlechtesten Ergebnisse traten in der Variante ohne Kältebehandlung „24°C für 8 Wochen“ auf.

3.2.1.2. Droplet-Technik

3.2.1.2.1 Vorbehandlung mittels osmotischer Dehydrierung

Sorbus torminalis

In einem Vorversuch waren Apices auf Medien mit 0,75 M Saccharose, bzw. 5% DMSO für zwei Tage inkubiert worden. Die Explantate des DMSO-Mediums entsprachen danach denen der Kontrolle und sahen normal aus, während die des Saccharose-Mediums in ihrem Turgor reduziert waren und das weiche Gewebe schlecht zu bearbeiten war. Daher sollte geprüft werden, auf welche Weise Elsbeere osmotisch dehydriert werden kann, ohne das Wachstum zu stark zu beeinträchtigen.

Tab. 27 Einfluss von Konzentration und Einwirkdauer verschiedener Osmotika auf Etablierung und Vermehrung von *Sorbus torminalis*. Ergebnisse von Klon 283.

Behandlung			Transfer 1		Transfer 2
Osmotikum	Konzentration [M]	Dauer [Tage]	vitale Apices [%]	etablierte Apices [%]	Vermehrungskoeffizient
Kontrolle	-	1	100	20	4,6
	-	3	100	10	2,7
Mannitol	0,4	1	90	20	4,0
	0,4	3	100	80	7,7
	1,0	1	100	50	3,3
	1,0	3	100	20	1,6
Saccharose	0,4	1	100	30	1,3
	0,4	3	100	40	4,1
	1,0	1	100	10	1,9
	1,0	3	80	20	1,6
Sorbitol	0,4	1	100	10	1,6
	0,4	3	100	0	1,0
	1,0	1	100	30	4,3
	1,0	3	100	0	1,1

Mannitol, Saccharose und Sorbitol wurden dem Medium 2/11 in Konzentrationen von je 0,4 M und 1,0 M zugesetzt. Auf diesen Medien und dem Kontrollmedium 2/11 ohne Zusatz wurden Apices des Klons 283 für einen Tag, bzw. drei Tage im Klimaschrank bei +5°C und 12 Stunden Belichtung inkubiert, mit 10 Apices pro Variante. Danach wurden sie auf das Medium 2/11 ohne Zusätze umgesetzt und im normalen Klimaraum standardmäßig weiterkultiviert, bis sie in die Vermehrungsphase eintraten. Dies war nach 2 ½ Monaten der

Fall. Eine Bonitur mit Ermittlung der abgestorbenen, bzw. vitalen Sprosse und der etablierten Sprosse wurde beim ersten Transfer nach der Behandlung vorgenommen. Beim zweiten Transfer nach Behandlung wurden die Vermehrungskoeffizienten ermittelt (Tabelle 27).

Die Vitalität der Sprosse betrug bis auf zwei Ausnahmen 100 %. Der Prozentsatz etablierter Sprosse variierte sehr stark zwischen 0% und 80%. Er war nur bei den Varianten ‚Sorbitol 0,4 M und 1,0 M für 3 Tage‘ niedriger als die Kontrolle. Alle Mannitol-Varianten waren gleich der Kontrolle oder besser.

Vermehrungskoeffizienten größer als 2 wurden außer bei den Kontrollen hauptsächlich bei den Mannitol-Varianten erreicht. Lediglich die höhere Konzentration mit der längeren Einwirkzeit führte zu einem niedrigen Vermehrungskoeffizient. Die höchste in diesem Versuch erzielte Vermehrungsrate wurde auf 0,4 M Mannitol bei dreitägiger Einwirkung ermittelt. Diese Sprosse waren von besonders guter Qualität. Die Sprosse auf den Medien mit Saccharose und Sorbitol-Zusätzen wiesen trotz teilweise hoher Vermehrungskoeffizienten mehrfach Deformationen auf und waren in den Varianten mit dreitägiger Einwirkung stark vitrifiziert.

Zur Prüfung der besseren Verträglichkeit der Osmotika wurde das **schrittweise Dehydrieren** durch Zugabe von Mannitol, Saccharose und Sorbitol durchgeführt. Hierfür wurden die Apices zunächst für einen Tag bei einer Konzentration von 0,1 M inkubiert, danach für einen Tag bei 0,4 M, dann 0,7 M und zuletzt 1,0 M. Die höchste Konzentration von 1,0 M wurde für einen Tag und drei Tage appliziert. Die gesamte Behandlung erfolgte im Klimaschrank bei +5°C und 12 Stunden Belichtung, also insgesamt über einen Zeitraum von 4, bzw. 6 Tagen, mit 10 Apices des Klons 283 pro Variante. Danach wurden die Explantate auf das Medium 2/11 ohne Zusätze umgesetzt und im normalen Klimaraum standardmäßig weiterkultiviert, bis sie in die Vermehrungsphase eintraten. Dies war nach 2 ½ Monaten der Fall. Eine Bonitur mit Ermittlung der abgestorbenen, bzw. vitalen Sprosse und der wachsenden Sprosse wurde beim ersten Transfer nach der Behandlung vorgenommen. Beim zweiten Transfer nach Behandlung wurden die Vermehrungskoeffizienten ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 28.

Tab. 28 Einfluss von schrittweiser Dehydrierung und Einwirkdauer verschiedener Osmotika auf Wachstum und Vermehrung von *Sorbus torminalis*. Ergebnisse von Klon 283.

Behandlung		Transfer 1		Transfer 2
Medien-zusatz	Einwirkdauer bei Endkonzentration [Tage]	vitale Apices [%]	etablierte Apices [%]	Vermehrungs-koeffizient
Kontrolle	1	100	10	3,1
	3	100	30	3,0
Mannitol	1	100	0	1,0
	3	100	30	1,8
Saccharose	1	80	0	1,4
	3	100	0	1,0
Sorbitol	1	100	0	1,2
	3	100	0	1,0

Die hohen Vermehrungskoeffizienten der Kontrollen belegen, dass die relativ kühle Kulturtemperatur von 5°C unmittelbar nach Präparation von den Apices gut vertragen wurde. Jedoch hatte die schrittweise Erhöhung der osmotisch wirksamen Konzentrationen nicht den gewünschten Effekt einer besseren Verträglichkeit. Es gab zwar einen hohen Anteil vitaler Apices, aber sie waren in ihrer Entwicklung stark beeinträchtigt. Sofern sich überhaupt Sprosse bildeten, waren sie meist stark deformiert und vielfach vitrifiziert. Dies spiegelt sich in den niedrigen Vermehrungskoeffizienten wieder. Relativ am besten wurde Mannitol mit der längeren Einwirkzeit vertragen, jedoch waren auch hier 4 von 7 Sprossen deformiert, was bereits im nächsten Transfer die Vermehrung beeinträchtigt hätte.

3.2.1.2.2 Untersuchungen zur Toxizität von DMSO

Da DMSO (Dimethylsulfoxid) zu den am häufigsten verwendeten Gefrierschutz-Additiva zählt, gehört es zu den Grundlagen für jegliche Art von Einfrierversuchen, die Toleranzgrenzen des zu untersuchenden Materials hinsichtlich Konzentration und Einwirkdauer von DMSO zu kennen. Um die genotypspezifische Reaktionsbreite zu erfassen, wurden bei Wildbirne 3 Klone mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten ausgewählt und bei Elsbeere, als der empfindlicheren Pflanzenart, 4 Klone. Dies waren:

die Wildbirnen - Klone 5, 439-28, 59-2 und

die Elsbeeren - Klone 18/2, 85, 146, 283.

DMSO wurde in den Konzentrationen 0, 5, 10 und 20 % (v/v) mit Einwirkzeiten von 1, 2, 3, 4 und 17 Stunden geprüft. Danach wurden die Apices kurz in Flüssigmedium gespült und für zwei Wochen auf einem Agarosetropfen kultiviert (Abbildung 39 im Anhang), bevor sie auf festes Medium umgesetzt wurden. Die Bonitur auf Vitalität, bzw. Etablierung (Sprosswachstum) erfolgte nach 5 Wochen. Als „nicht vital“ wurden sowohl die abgestorbenen Explantate eingestuft als auch solche, die zwar noch grün waren, aber noch nicht oder kaum mit der Blattentfaltung begonnen hatten, also im Wachstum deutlich hinter der Kontrolle zurückgeblieben waren. Die Sprossachsen der Gruppe „vital“ waren zwischen 5 und 30 mm lang.

Pyrus pyraeaster

Der Anteil etablierter Apices lag ohne DMSO-Einfluß zwischen 37% und 57% (Tabelle 29). DMSO in der Konzentration von 5% reduzierte dies nicht, sondern schien bei einer und zwei Stunden Einwirkzeit sogar fördernd zu wirken.

Tab. 29 Einfluss von DMSO auf die Etablierung von *Pyrus pyraeaster* (je 10 Apices der Klone 5, 439-28, 59-2). Ergebnisse von 30 Explantaten in %

* bakteriell kontaminiert

Einwirkung	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden	4 Stunden	17 Stunden
0 % DMSO	40	43	57	37	40
5 % DMSO	70	65	50	0*	43
10 % DMSO	63	57	30	40	20
20 % DMSO	20	27	23	30	0

Der Verlust der Vitalität bei vier Stunden Einwirkzeit ist vermutlich auf eine bakterielle Kontamination zurückzuführen. Die Konzentration von 10% führte bei 1 und 2 Stunden

Einwirkzeit ebenfalls zu höherer Vitalität und wirkte sich erst bei der sehr langen Einwirkzeit von 17 Stunden negativ aus. Die 20%ige Konzentration verminderte die Vitalität bei allen getesteten Einwirkzeiten.

Sorbus torminalis

Wie in Tabelle 30 gezeigt wird, liegt die Etablierungsrate der Kontrolle mit Werten um 70% auf einem höheren Niveau als bei Wildbirne (Tabelle 29). Sie wird mit steigender DMSO-Konzentration, bis auf eine Ausnahme in der Variante „5% für 2 Stunden“, abgesenkt, ebenso mit längerer Einwirkzeit. Die geforderte Mindestvitalitätsrate von 50% wird bei der Konzentration von 5% und Einwirkdauer bis zu vier Stunden erreicht, bzw. bei der 10%igen Konzentration und Einwirkdauer von einer Stunde. Insgesamt reagierte Elsbeere deutlicher und sensibler auf die DMSO-Einwirkung als Wildbirne.

Tab. 30 Einfluss von DMSO auf die Etablierung von *Sorbus torminalis*- (je 10 Apices der Klone 18/2, 85, 146, 283). Ergebnisse von 40 Explantaten in %.

Einwirkung	1 Stunde	2 Stunden	3 Stunden	4 Stunden	17 Stunden
0 % DMSO	73	68	73	73	43
5 % DMSO	58	75	55	50	25
10 % DMSO	68	45	38	18	25
20 % DMSO	25	15	8	8	0

3.2.1.2.3 Kombinationen von Vorbehandlungen

Pyrus pyraeaster

Die folgenden Versuche wurden mit den Klonen 5, 59-2 und 439-28 durchgeführt. Pro Variante wurden jeweils 10 Explantate benutzt.

Vorbehandlung mit Kälte, DMSO und Saccharose

Dem Grundmedium 87/37 wurde 5% (v/v) DMSO zugesetzt. Darauf wurden Apices für 20 Stunden bei +4°C inkubiert. Außerdem wurden Sprosssegmente von 1,5 bis 2 mm Länge mit je einer Achselknospe für 4, bzw. 5 Tage bei +4°C in Dunkelheit für 16 Stunden und bei +20°C im Licht für 8 Stunden inkubiert. Dann wurden alle Explantate auf halbfestes 87/37-Medium ohne Zusatz umgesetzt und standardmäßig im Klimaraum weiterkultiviert.

Bei der Bonitur nach 5 Wochen zeigten alle Varianten im Vergleich zur Kontrolle ein gutes Sprosswachstum und waren ohne Stresssymptome. Die Variante „5 Tage DMSO-Einwirkung“ übertraf die Kontrolle im Wachstum und erwies sich als die beste Variante.

Zur Prüfung der Saccharose-Verträglichkeit wurden 0,8 M Saccharose dem Medium 87/37 zugesetzt. Sowohl Apices als auch Sprosssegmente wurden für jeweils 2 Stunden und 6 Stunden bei +4°C inkubiert und dann auf Normalmedium umgesetzt und standardmäßig weiterkultiviert. Bei der Bonitur nach 5 Wochen waren alle Varianten gegenüber der Kontrolle im Wachstum leicht zurückgeblieben. Die Pflanzen wiesen Stresssymptome auf: Die Blätter waren kleiner als bei der Kontrolle und zeigten bräunliche Verfärbungen. Es starben keine Explantate ab. Die Größenunterschiede zwischen Sprosssegmenten und Apices blieben proportional bestehen. Das bedeutet, dass die Apices nicht empfindlicher reagierten als die Sprosssegmente.

Vorbehandlung mit Kälte, DMSO, Saccharose und Vitrifizierung

Zusätzlich zu den bereits geschilderten Vorbehandlungen wurden Apices für 10 und 20 Minuten in der Vitrifizierungslösung PVS2 (Plant Vitricification Solution No.2 nach YAMADA et al., 1991) inkubiert. Die Inkubation wurde durch zweimaliges Spülen in Spüllösung beendet. Danach wurden die Apices standardmäßig weiterkultiviert. Die Ergebnisse dieser kombinierten Behandlung zeigt Tabelle 31.

Tab. 31 Einfluss von Vorbehandlung und Inkubation in PVS2-Vitrifizierungslösung auf das Wachstum von *Pyrus pyraaster*. Ergebnisse von 30 Explantaten pro Variante (je 10 Apices der Klone 5, 59-2, 439-28)

Die Vorbehandlung erfolgte bei 0°C.

Variante	Vorbehandlung		PVS2-Inkubation [Minuten]	Wachstum nach 8 Wochen	
	Medium-zusatz	Dauer [Stunden]		[Anzahl Explantate, Bonitur: W = Wachstum]	%
1	-	20 h	0'	24, gutes W	80
2	-	20 h	10'	7, wenig W	23
3	-	20 h	20'	2, wenig W	7
4	DMSO	20 h	0'	9, gutes W, (21 Kallus)	30 (100)
5	DMSO	20 h	10'	15, wenig W	50
6	DMSO	20 h	20'	2, wenig W	7
7	Saccharose	2 h	0'	19, gutes W	63
8	Saccharose	2 h	10'	16, kaum W	53
9	Saccharose	2 h	20'	9, kaum W	30
10	Saccharose	6 h	0'	21, gutes W	70
11	Saccharose	6 h	10'	6, wenig W	20
12	Saccharose	6 h	20'	3, wenig W	10

Die Pflanzen wurden durch die Vorbehandlung in jeder Variante gestresst, was durch die verminderte Anzahl wachsender Apices gegenüber den Kontrollen zum Ausdruck kam. Den geringst möglichen Schaden im Vergleich zur 0-Minuten-Kontrolle (Variante 1) hatten die DMSO-Varianten 4 und 5, in Verbindung mit keiner oder 10 minütiger PVS2-Inkubation erlitten.

Die 2- und 6-stündigen Saccharose-Behandlungen ohne PVS2-Einwirkung (Varianten 7 und 10) zeigten zwar gute Ergebnisse, waren aber als Kontrollen angelegt, da sie als Vorbereitung für die Kryokonservierung nicht ausreichen. Saccharose-Varianten in Kombination mit PVS2,

insbesondere die 6-stündige Saccharose-Einwirkung (Varianten 11, 12) beeinträchtigten das Wachstum so sehr, dass eine Wiederholung nicht sinnvoll erschien.

Einfluss von Vorbehandlungskombinationen auf die Vitalität ohne und mit Kryokonservierung

Es wurde geprüft, ob eine zusätzlich zu den obengenannten Vorbehandlungen mit DMSO oder Saccharose und PVS2 durchgeführte 20minütige Vorinkubation in einer Vorinkubationslösung vertragen wird. Den Versuchsaufbau mit der Bezeichnung der Varianten gibt Tabelle 32 wieder.

Tab. 32 Versuchsaufbau bei der Prüfung verschiedener Vorbehandlungskombinationen für das Einfrieren nach der Droplet-Methode

Medium: 87/37

Vorausgegangene Kälteapplikation : 0°C für 20 Stunden

Mediumzusatz: 5% (v/v) DMSO

Vorinkubation: 20 Minuten in MS-Flüssigmedium mit 0,4 M Saccharose und 2,0 M Glycerin

Nach PVS2-Inkubation direktes Einfrieren in Flüssigstickstoff (LN).

Variante	Vorbehandlung Medium- zusatz	Vor- inkubation	PVS2- Inkubation [Minuten]
1	-	-	0'
2	-	-	5'
3	-	-	15'
4	-	ja	0'
5	-	ja	5'
6	-	ja	15'
7	DMSO	-	0'
8	DMSO	-	5'
9	DMSO	-	15'
10	DMSO	ja	0'
11	DMSO	ja	5'
12	DMSO	ja	15'

Da diese Behandlungen von dem Klon 59-2 gut vertragen wurden (Tabelle 33: Wachstum nach 8 Wochen sine cryo; Abbildung 41 im Anhang), wurden sie in einem Gefrierexperiment mit der Droplet-Technik für die drei Klone 5, 59-2 und 439-28 eingesetzt. Nach dem Auftauen wurden die Apices auf Medium 87/37 unter Standardbedingungen kultiviert. Die Bonitur des Wachstums erfolgte nach 8 und 24 Wochen. Wie in vorangegangenen Versuchen wurden nur solche Explantate als wachsend bonitiert, die Sprosswachstum zeigten.

Tab. 33 Einfluss von Vorbehandlung mit DMSO, Vorinkubationslösung und PVS2 auf das Wachstum von *Pyrus pyraster* nach Kryokonservierung. Ergebnisse von je 10 Apices der Klone 5, 59-2, 439-28 pro Variante.

Varianten: Entsprechend dem Versuchsaufbau in Tabelle 32.

sine cryo: ohne Kryokonservierung

post cryo: nach Kryokonservierung

	Wachstum nach 8 Wochen						Wachstum nach 24 Wochen			
	Kontrolle (sine cryo)		post cryo				post cryo			
Klon	59-2		59-2	5	439-28	Gesamt	59-2	5	439-28	Gesamt
Vari- ante	n	%	n	n	n	%	n	n	n	%
1	10	100	0	0	0	0				
2	10	100	3	4	4	37	2	1	1	13
3	4	40	2	0	5	23			2	7
4	10	100	0	0	1	3				
5	8	80	0	4	3	23		3	1	13
6	2	20	0	2	3	17		2	2	13
7	10	100	0	0	0	0				
8	10	100	0	1	6	23				
9	10	100	0	1	2	10				
10	9	90	0	0	2	7				
11	10	100	0	0	0	0				
12	8	80	0	0	4	13				
Gesamt	111 von 120	93%	47 von 360			13%	14 von 360			4%

Von allen drei Klonen gab es regenerierende Varianten (Tabelle 33). Von 360 geprüften Apices waren nach vier Wochen 47 (13%) vital und zeigten Zeichen beginnenden Wachstums (Abbildung 37 im Anhang). Der Übergang in die Vermehrungsphase erfolgte nach 20 Wochen bei 14 Explantaten (4%). Die letztendlich erfolgreichen Varianten 2, 3, 5 und 6 stellten die Behandlung mit der Vitrifizierungslösung PVS2 für 5 und 15 Minuten dar. Die Kombination der Vitrifizierung mit der Vorinkubation (Varianten 5 und 6) wirkte sich klonspezifisch aus: Verbesserung bei Klon 5, ohne Einfluss bei Klon 439-28 und Verschlechterung bei Klon 59-2. Dieser hatte bereits ohne Kryokonservierung mit Vitalitätsdepression auf die Behandlung mit Vorinkubationslösung reagiert.

Aus den Varianten mit DMSO-Vorbehandlung (Varianten 7 bis 12) zeigte 24 Wochen post cryo keiner der 3 Klone Wachstum.

3.2.2. Kryokonservierung von *Pyrus pyra*ster- Winterknospen

3.2.2.1. Einfluss der Geschwindigkeit von Gefrieren und Auftauen

Direktes Einfrieren in Flüssigstickstoff (LN) ohne Vorgefrieren („LN direkt“) wurde mit dem schrittweisen Einfrieren („Vorgefrieren“) bei -5, -10, -20 und -30°C für je einen Tag vor dem Einfrieren in LN verglichen. Beide Varianten wurden sowohl mit langsamem Auftauen bei 0°C als auch mit schnellem Auftauen bei 40°C geprüft. Die Vitalität der Winterknospen wurde mittels TTC-(Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-)Test festgestellt.

Unabhängig vom verwendeten Material, das nach Erntezeitpunkt, Alter und Art der Bäume sehr unterschiedlich war, ergab immer das schrittweise Vorgefrieren, kombiniert mit langsamem Auftauen die besten Vitalitätsraten (Abbildung 12).

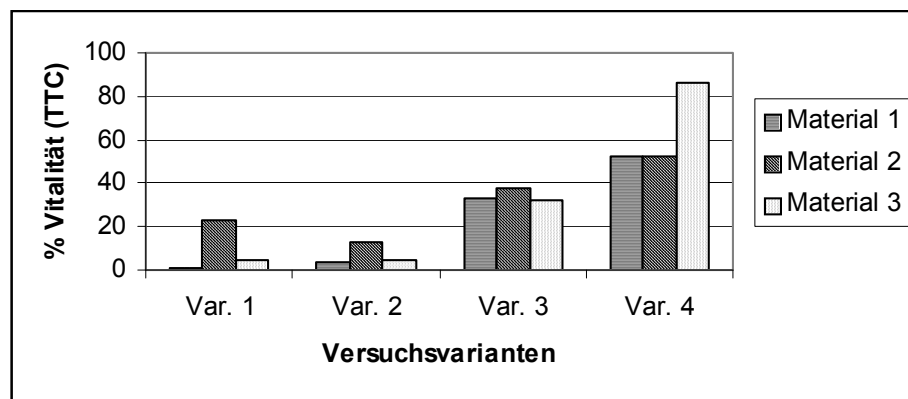


Abb. 12 Einfluss von schrittweisem Vorgefrieren und unterschiedlichen Auftautemperaturen auf die Vitalität von Winterknospen von *Pyrus pyra*ster

Material 1: Klone 1067-1 bis 1067-15, Reiserwerbung Ende September 1998 (6 Monate vor Versuch), Anzahl Knospen: 568

Material 2: 3-jährige Pfropflinge im Container, 4 Klone, Reiserwerbung Anfang Februar 1999 (4 Wochen vor Versuch), Anzahl Knospen: 337

Material 3: 8-jährige Pfropflinge im Feld, 8 Klone, Reiserwerbung Ende Februar 1999 (1 Tag vor Versuch), Anzahl Knospen: 746

Versuchsvarianten:

Var. 1 = LN direkt, Auftauen bei 40°C

Var. 2 = LN direkt, Auftauen bei 0°C

Var. 3 = Vorgefrieren, Auftauen bei 40°C

Var. 4 = Vorgefrieren, Auftauen bei 0°C

Der Einfluss der Auftaugeschwindigkeit war sehr gering, wenn kein Vorgefrieren erfolgt war, verbesserte jedoch die Überlebensraten, wenn schrittweise eingefroren wurde. Das Vorgefrieren übte einen beträchtlichen Einfluss aus, da es sich in allen Fällen, unabhängig vom Material oder der Auftautemperatur, deutlich positiv auswirkte. Auf Grund dieser Versuchsergebnisse wurden die folgenden Gefrierversuche mit Winterknospen alle mit schrittweisem Vorgefrieren und langsamem Auftauen durchgeführt.

3.2.2.2. Einfluss von Genotyp und Individuum

Für Genbank-Zwecke ist es erforderlich, dass eine Methode auf eine Vielzahl von Genotypen anwendbar ist. Die unter 3.2.2.1. geschilderte Methode des schrittweisen Vorgefrierens und langsamen Auftauens sollte daher in diesem Sinne geprüft werden. Winterknospen von 17 Genotypen des Wildbirnenklonarchivs (siehe Tabelle 4 in Kap. 2.1.1.) wurden dafür verwendet. Nach dem Auftauen wurden sie sowohl mittels TTC-Test auf Vitalität geprüft als auch für die in vitro Kultur präpariert. Bei 7 der 17 Klone standen mehrere Bäume (Individuen) eines Genotyps auf der Versuchsfläche. Sie wurden als Wiederholung innerhalb des Klons verwendet.

Jeweils 20 Knospen pro Baum wurden mit der TTC-Färbung sowohl vor als auch nach Kryokonservierung auf Vitalität geprüft (vital TTC) (Abbildungen 36 c und d im Anhang). und 15 - 30 Knospen nach Präparation der Apices in die in vitro Kultur überführt. Die Bonitur der Vitalität in vitro erfolgte 4 Wochen nach der Präparation (vital T4). Als Kriterium für "lebend" galt die Entfaltung grüner Blätter. Als etabliert wurden Apices dann eingestuft, wenn nach der Entfaltung der Blätter die Vermehrungsphase mit Sprossbüschelbildung eintrat.

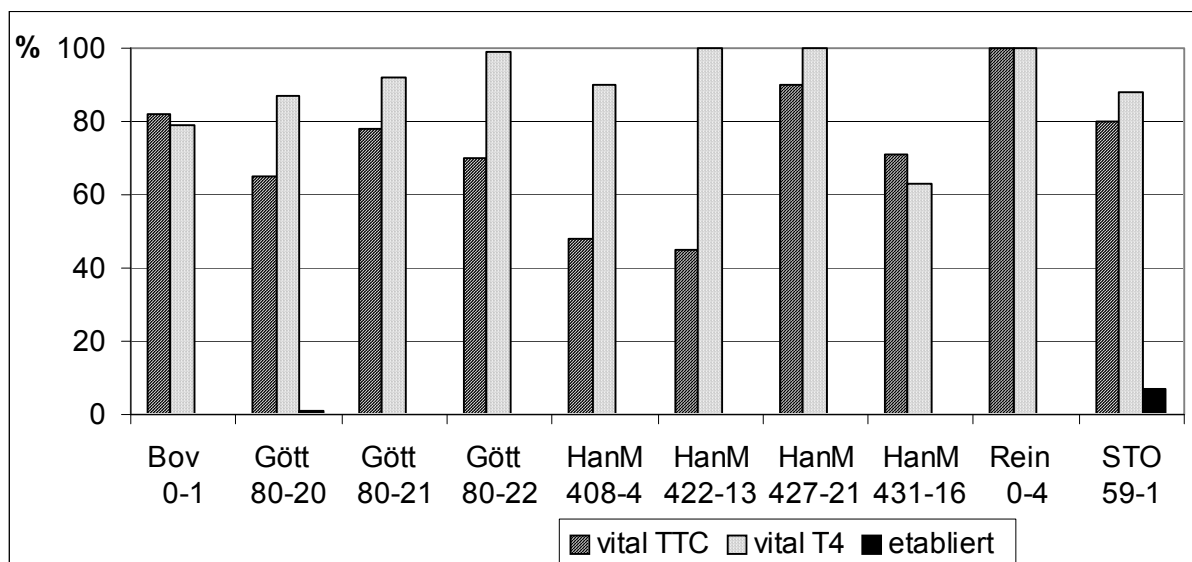


Abb. 13 Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraaster*-Winterknospen nach Kryokonservierung. Ergebnisse von 10 Genotypen mit je einem Individuum.

Kryokonservierungsmethode: Schrittweises Vorgefrieren, langsames Auftauen bei 0°C

vital TTC: Vitalitätsprüfung mittels TTC-Test

vital T4: Bonitur der Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices (Entfaltung grüner Blätter)

etabliert (iv): Sprosswachstum in vitro

Die im TTC-Test ermittelten hohen Vitalitätswerte wurden von der Vitalität in vitro in den meisten Fällen noch übertroffen. Die Durchschnittswerte betrugen im TTC-Test 71 % und im in vitro Test 77 %. Die Etablierungen standen nicht im Zusammenhang mit einem der Vitalitätswerte. Die Etablierung mit anschließendem Sprosswachstum gelang bei 8 Bäumen aus 6 Klonen. Bei den Genotypen, die mit mehreren Individuen geprüft wurden, regenerierte in drei Fällen jeweils nur 1 Individuum und nur in einem Fall, bei dem Klon Rein 0-5, alle drei geprüften Individuen. Die Abbildung 13 stellt die Ergebnisse für jeden Klon, der mit 1

Individuum vertreten war, dar, und Abbildung 14 für die Klone, von denen es mehrere Individuen gab.

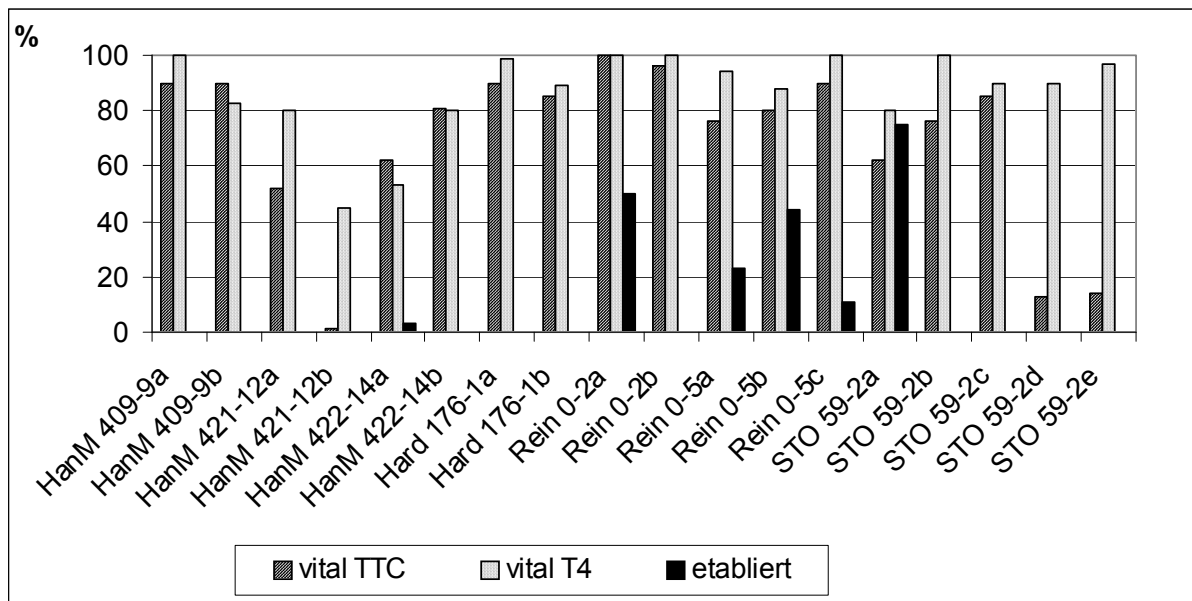


Abb. 14 Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraaster*-Winterknospen nach Kryokonservierung. Ergebnisse von 7 Genotypen mit je zwei oder mehr Individuen.

Methode: wie bei Abb. 13 beschrieben

Die verschiedenen Individuen eines Genotyps sind mit kleinen Buchstaben (a, b, c usw.) bezeichnet.

Die Ergebnisse sind erwartungsgemäß Genotyp-abhängig. Die Unterschiede zwischen den Individuen desselben Genotyps waren erheblich größer als erwartet. Beispiel: STO 59-2a war mit 76% etablierten Apices der beste Klon des Versuchs. Die Individuen STO 59-2 b, c, d und e, von denen ebenfalls ein hoher Etablierungserfolg zu erwarten gewesen war, wurden dagegen überhaupt nicht etabliert. Es ist in Erwägung zu ziehen, ob diese Unterschiede durch Vertauschen von Material, bzw. falsche Beschriftung, zu erklären sind oder auf einem nicht erkannten Durchwachsen der Unterlage beruhen.

Als Konsequenz aus diesem Versuchsergebnis wurden für die folgenden Versuche immer dieselben Bäume beerntet.

3.2.2.3. Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung

3.2.2.3.1 Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung

Der Einfluss des Reisererntetermins auf die Kontaminations-, Vitalitäts- und Etablierungsraten nach Kryokonservierung wurde in 2 aufeinander folgenden Jahren geprüft. Die Ergebnisse sind für Serie 1 (1999/2000) in Abbildung 15a und für Serie 2 (2000/2001) in Abbildung 15b dargestellt. Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 34 aufgeführt.

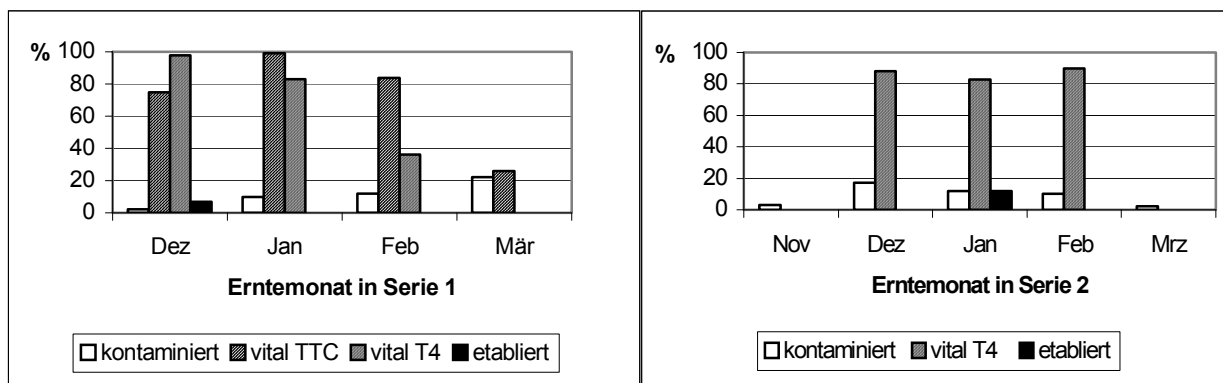


Abb. 15a und 15b Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraaster*– Winterknospen nach Kryokonservierung: Einfluss des Reisererntetermins.

Erntemonate in Serie 1: Dezember, Januar, Februar, März in 1999 / 2000

Erntemonate in Serie 2: November, Dezember, Januar, Februar, März in 2000 / 2001

Ergebnisse von den Klonen 95-1, 95-12, 95-14

vital TTC: Vitalitätsprüfung im TTC-Test

vital T4: Bonitur der Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

etabliert: Sprosswachstum in vitro

Die in vitro Kultur wurde durch Kontaminationen nicht wesentlich behindert. Bis auf drei Ausnahmen fielen von den meist 20 präparierten Knospen nur 0 bis 3 durch Bakterien- oder Pilzbefall aus (Tabelle 34). Eindeutige Unterschiede gab es weder im Verlauf des Winters (zwischen den Ernteterminen), noch zwischen den beiden Jahren, noch zwischen den 3 Klonen.

Die Vitalität T4 vier Wochen nach der Präparation für die in vitro Kultur war nur bei den Ernten im Dezember, Januar und Februar feststellbar. Bei den Ernten im November ebenso wie im März waren bei allen Klonen alle Apices so stark geschädigt, dass sie nicht als vital eingestuft werden konnten. Bei den Erntezeitpunkten Dezember und Januar zeigten die Klone 95-1 und 95-12 kaum Unterschiede zwischen den Jahren und lagen in dem hohen Bereich von über 70%, während der Klon 95-14 sowohl zu den einzelnen Erntezeitpunkten als auch zwischen den Jahren sehr unterschiedliche Werte zwischen 0% und 100% aufwies. Bei Ernte im Februar lag die Vitalität bei allen 3 Klonen in der 1. Serie mit den Werten 70%, 32% und 5% deutlich niedriger als in der 2. Serie mit 100%, 100% und 67%. Auch hier war der Klon 95-14 in jedem Jahr der schwächste. Die von Dezember bis März beinahe linear fallende Tendenz der Durchschnittswerte in der 1. Serie stellte sich in der 2. Serie vollkommen anders dar: Von 0% im November sprang sie auf 88% im Dezember, blieb mit 83% und 90% auf dem hohen Niveau in Januar und Februar und war im März wieder auf 0% gefallen.

Ein Vergleich in der 1. Serie zwischen der Vitalität T4 (in vitro) und dem TTC-Test zeigt wenig Parallelen. Im Dezember lag der TTC-Wert um 23 Prozentpunkte unter dem in vitro Wert, im Januar 16 Prozentpunkte darüber, im Februar 38 Prozentpunkte und im März 26 Prozentpunkte darüber. Damit war weder eine Regelmäßigkeit noch eine Tendenz in der Relation TTC-Test zu Vitalität T4 feststellbar. In Serie 2 war auf Grund von Materialmangel der TTC-Test nicht durchführbar.

Tab. 34 Einfluss des Reisererntetermins auf die Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraeaster* – Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen in den Jahren 1999/2000 (Serie 1) und 2000/2001 (Serie 2)

Vitalität T4: Bonitur der Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices
Fett umrandet: Erfolgreiche Varianten

Erntetermin		Klon	Apices gesamt	Kontamination		Vitalität T4		Etablierung	
Monat	Jahr		n	n	%	n	%	n	%
November	2000	95-1	20	0	0	0	0	0	0
	2000	95-12	20	2	10	0	0	0	0
	2000	95-14	20	0	0	0	0	0	0
Dezember	1999	95-1	20	0	0	20	100	0	0
	2000	95-1	20	2	10	20	100	0	0
	1999	95-12	20	1	5	19	95	0	0
	2000	95-12	20	2	10	19	95	0	0
	1999	95-14	20	0	0	20	100	4	20
	2000	95-14	19	6	32	13	68	0	0
	2000	95-1	18	2	11	16	89	0	0
	2000	95-12	18	1	6	18	100	0	0
Januar	2001	95-12	20	3	15	20	100	3	15
	2000	95-14	5	1	20	0	0	0	0
	2001	95-14	19	2	11	15	79	4	21
	2000	95-1	20	1	5	14	70	0	0
	2001	95-1	13	3	23	13	100	0	0
Februar	2000	95-12	19	5	26	6	32	0	0
	2001	95-12	8	0	0	8	100	0	0
	2000	95-14	20	1	5	1	5	0	0
	2001	95-14	9	0	0	6	67	0	0
	2000	95-1	20	0	0	0	0	0	0
	2001	95-1	5	1	20	0	0	0	0
	2000	95-12	20	1	5	0	0	0	0
März	2001	95-12	2	0	0	0	0	0	0
	2000	95-14	20	12	60	0	0	0	0
	2001	95-14	3	0	0	0	0	0	0

Wie in den Abbildungen 15a und 15b dargestellt, erfolgte eine Etablierung, definiert durch Sprosswachstum und Vermehrung (Regeneration), bei beiden Serien nur zu jeweils einem Termin: In Serie 1 regenerierten im Dezember 4 Apices des Klons 95-14, entsprechend 7% der Explantate. In Serie 2 regenerierten im Januar 3 Apices des Klons 95-12, sowie 4 Apices des Klons 95-14, entsprechend 12% der Explantate. Von dem Klon 95-1, der fast genau so hohe Vitalitätsraten aufwies wie Klon 95-12 und erheblich höhere als Klon 95-14, regenerierte kein Explantat.

3.2.2.3.2 Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung

Durch die Reiserlagerung veränderten sich alle betrachteten Parameter. Die Abbildungen 16a und 16b veranschaulichen die Ergebnisse für die 3 Klone. Die dazugehörigen Einzelwerte sind in Tabelle 35 aufgeführt.

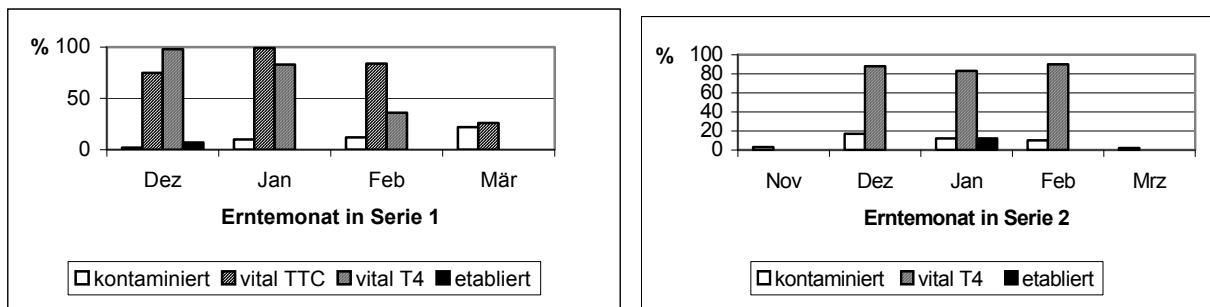


Abb. 16a und 16b Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraaster*– Winterknospen nach Kryokonservierung: Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung

Entemonate in Serie 1: Dezember, Januar, Februar, März in 1999 / 2000

Erntemonate in Serie 2: November, Dezember, Januar, Februar, März in 2000 / 2001

Ergebnisse von den Klonen 95-1, 95-12, 95-14

vital TTC: Vitalitätsprüfung im TTC-Test

vital T4: Bonitur der Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

etabliert: Sprosswachstum in vitro

Die Kontaminationen der Klone 95-1 und 95-14 waren nach der Reiserlagerung mit Werten zwischen 0% und 30% in Serie 1 und 7% und 20% in Serie 2 höher als ohne Lagerung. Über 30% lag nur Klon 95-12, der zwischen den beiden Jahren sehr unterschiedliche Werte aufwies.

Die Vitalitätswerte T4 nach 4-wöchiger in vitro Kultur wiesen bei den Ernten im Dezember, Januar und Februar ein um ca. 20 bis 30 Prozentpunkte niedrigeres Niveau auf als ohne Lagerung und lagen in Serie 1 zwischen 73% im Dezember und 7% im März (Abb. 15a, 16a). In Serie 2 fiel auf, dass die Knospen des Erntetermins November zu 82% vital waren, während sie ohne Lagerung keine Vitalität gezeigt hatten (Abb. 15b, 16b).

Die TTC-Tests der Serie 1 der Ernten Dezember, Januar und Februar lagen mit 92%, 76% und 69% im gleichen Bereich wie ohne Lagerung. Der März-Wert von 6% lag erheblich unter den vorher ermittelten 26% (Abb. 15a, 16a).

Mit Reiserlagerung vor Kryokonservierung wurden höhere Etablierungsraten erzielt als ohne Reiserlagerung (Tabellen 34 und 35). In Serie 1 erfolgte nach Ernte im Dezember bei 7% der Explantate Sprosswachstum und nach Ernte im Januar bei 35% der Explantate. Dies ist von allen Varianten der Kryokonservierung von Winterknospen bei Wildbirne das beste Ergebnis.

Tab. 35 Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf die Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Pyrus pyraster* – Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen in den Jahren 1999/2000 (Serie 1) und 2000/2001 (Serie 2)

Vitalität T4: Bonitur der Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

* Knospen während der Präparation als tot eingestuft und verworfen

Fett umrandet: Erfolgreiche Varianten

Erntetermin		Klon	Apices gesamt	Kontamination		Vitalität T4		Etablierung	
Monat	Jahr		n	n	%	n	%	n	%
November	2000	95-1	20	2	10	19	95	3	15
	2000	95-12	20	5	25	15	75	0	0
	2000	95-14	20	2	10	15	75	0	0
Dezember	1999	95-1	20	2	10	17	85	0	0
	2000	95-1	19	2	11	17	89	0	0
	1999	95-12	20	17	85	12	60	4	20
	2000	95-12	20	10	50	11	55	0	0
	1999	95-14	20	1	5	15	75	0	0
	2000	95-14	20	2	10	6	30	0	0
Januar	2000	95-1	20	3	15	13	65	1	5
	2001	95-1	15	1	7	14	93	0	0
	2000	95-12	20	8	40	12	60	15	75
	2001	95-12	15	1	7	14	93	0	0
	2000	95-14	20	0	0	14	70	5	25
	2001	95-14	15	1	7	0	0	0	0
Februar	2000	95-1	20	6	30	3	15	0	0
	2001	95-1	13	2	15	13	100	0	0
	2000	95-12	20	0	0	2	10	0	0
	2001	95-12	10	5	50	3	30	0	0
	2000	95-14	20	4	20	0	0	0	0
	2001	95-14	2	0	0	2	100	0	0
März	2000	95-1	20	3	15	0	0	0	0
	2001	95-1	20	*	*	*	*	*	*
	2000	95-12	20	3	15	4	20	0	0
	2001	95-12	20	*	*	*	*	*	*
	2000	95-14	20	2	10	0	0	0	0
	2001	95-14	20	*	*	*	*	*	*

Allerdings ließ es sich im Folgejahr nicht wiederholen: Beim Erntetermin Januar gab es keine Etablierungen. In Serie 2 erfolgte Sprosswachstum von 5% der Explantate nach Ernte im November, aber zu keinem anderen Termin. Im Hinblick auf den Einfluss des Genotyps ergab sich, dass der Klon 95-1 zweimal Regeneration zeigte: einmal mit 3 und einmal mit 1 Knospe. Der Klon 95-12 bildete Sprosse an 2 Terminen aus 4, bzw. 15 Knospen. Klon 95-14 regenerierte an 1 Termin aus 5 Knospen. Der Erntetermin Januar mit Reiserlagerung im Jahr 2000 war der einzige, an dem alle drei Klone gleichzeitig etabliert werden konnten.

3.2.2.3.3 Überblick über die Ergebnisse von Kapitel 3.2.2.3. Kryokonservierung von *Pyrus pyrastra* - Winterknospen, Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung

Einen Überblick über die Versuchsvarianten, die im Hinblick auf die Etablierung erfolgreich waren, gibt die Abbildung 17. Bei 5 der 10 geprüften Varianten (5 Erntetermine, jeweils ohne Lagerung und mit Lagerung) erfolgte Regeneration. Diese waren keine Wiederholungen zwischen den Serien, das heißt, dass jede erfolgreiche Variante nur entweder in der 1. Serie oder in der 2. Serie vorkam. Drei dieser Varianten waren aus der 1. Serie und zwei waren aus der 2. Serie. Der Einfluss der Reiserlagerung zeigte ebenfalls keine eindeutige Tendenz, da bei drei Ernteterminen mit Reiserlagerung und bei zwei Ernteterminen ohne Reiserlagerung Sprossbildung erfolgte. Nur die Gesamtanzahl etablierter Apices aus kryokonservierten Knospen zeigte einen Einfluß der Lagerung: Sie war mit 28 Stück (6%) nach Reiserlagerung höher als mit 11 Apices (2%) ohne Reiserlagerung. Dies war bedingt durch den Erntetermin Januar in der 1. Serie, bei dem alle drei Klone Regeneration zeigten.

Die Beteiligung der einzelnen Klone verteilte sich folgendermaßen: Klon 95-1 wurde zweimal mit insgesamt 4 Apices etabliert, Klon 95-12 wurde dreimal mit insgesamt 22 Apices etabliert und Klon 95-14 wurde dreimal mit insgesamt 13 Apices etabliert. Überschneidungen gab es bei zwei Varianten, wo einmal 2 Klone (2 Jan oL) und einmal 3 Klone (1 Jan mL) gleichzeitig regenerierten. Bei den anderen Varianten reagierte jeweils nur ein Klon positiv.

Die Ergebnisse zeigen: Alle drei geprüften Klone konnten nach Kryokonservierung etabliert werden. Die Sprossbildung erfolgte bei Reiserernte zwischen November und Januar und wurde durch Reiserlagerung positiv beeinflusst.

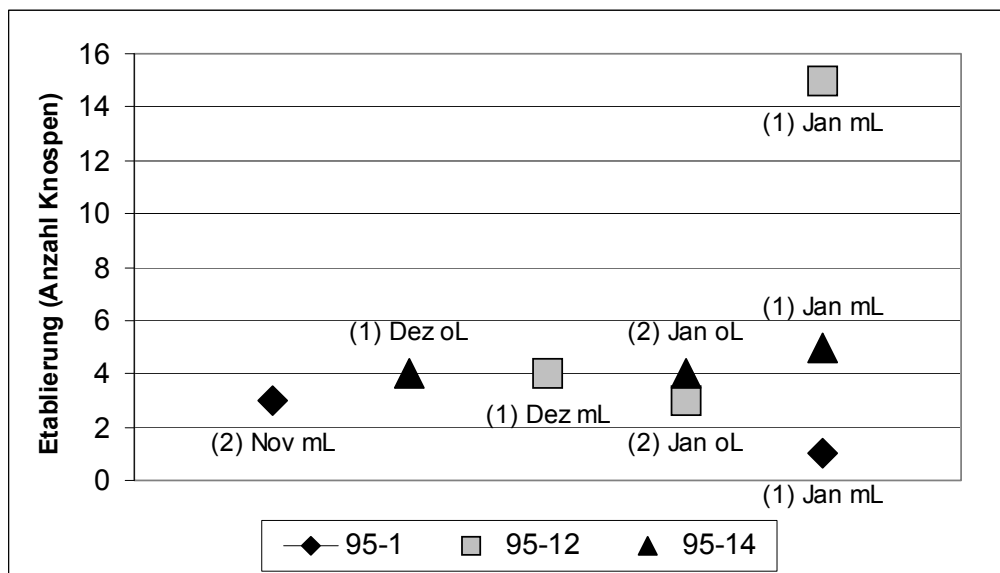


Abb. 17 Etablierung der *Pyrus pyrastra*-Klone 95-1, 95-12 und 95-14 nach Kryokonservierung der Winterknospen: Erfolgreiche Klone und Varianten.

(1) = aus Serie 1 (Winter 1999 / 2000)

(2) = aus Serie 2 (Winter 2000 / 2001)

Nov, Dez, Jan = Erntemonate November, Dezember, Januar

oL = ohne Lagerung der Reiser

mL = mit Lagerung der Reiser

Legende: Klonnummern

3.2.3. Kryokonservierung von *Sorbus torminalis* - Winterknospen

Es wurde geprüft, ob die an Wildbirne entwickelte Methode auf Elsbeere anwendbar ist. Die Prüfung der Vitalität mittels TTC-Test ist, wie bereits in Kap. 2.6.4.1. erwähnt, bei Elsbeere nicht möglich und kann daher im Folgenden auch nicht vorgestellt werden. Alle Vitalitätsprüfungen erfolgten in vitro. Die erste Vitalitätsbonitur wurde 4 Wochen nach der Präparation durchgeführt und **Vitalität T4** benannt. Die zweite Vitalitätsbonitur wurde 12 Wochen nach der Präparation durchgeführt und **Vitalität T12** genannt. (vgl. Erläuterungen in: Material und Methoden, Kap. 2.6.3.2.).

3.2.3.1. Einfluss der Auftautemperatur

Es wurde die Methode des schrittweisen Einfrierens (vgl. Kap. 3.2.2.1.) vor dem Einfrieren in Flüssigstickstoff (LN) angewendet. Als Auftautemperaturen wurden 0°C und 22°C (Raumtemperatur) geprüft. Die Reiser waren Anfang Februar vom Standort NFA Lutter (Klone 1077-7, -8, -9 -10) geerntet worden und bis zur Verwendung an den folgenden Tagen bei 4°C gelagert worden.

Die Vitalitätsprüfung in vitro ergab folgendes:

Vitalität T4 bei 0°C Auftautemperatur: Von 82 Apices waren 11, entsprechend 9%, vital.
Vitalität T12: 0% vital.

Vitalität T4 bei 22°C Auftautemperatur: Von 60 Apices waren 13, entsprechend 7%, vital.
Vitalität T12: 0% vital.

Auf Grund der Vitalität anzeigenden T4-Werte war anzunehmen, dass die Methode bei Elsbeere grundsätzlich anwendbar ist, wobei die Auftautemperatur unerheblich ist. Daher wurde Elsbeere bei dem folgenden Versuch „Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung“ wie Wildbirne behandelt und langsam bei 0°C aufgetaut.

3.2.3.2. Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung

Der Versuchsaufbau ist in Kap. 2.1.4. Material und Methoden beschrieben. Es werden im Folgenden die ermittelten Werte von Kontamination, Vitalität nach 4 und 12 Wochen (T4-, T12-Wert) und Etablierung dargestellt.

3.2.3.2.1 Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung

Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 36 dargestellt. Sie werden nach Bildung der Mittelwerte über alle Klone in den Abbildungen 18 a und b veranschaulicht.

Die Kontaminationen der Erntetermine Dezember, Januar und Februar lagen in der Serie 1 bei 30% und im März mit 15% halb so hoch. Im Vergleich dazu waren sie in der Serie 2 mit Werten zwischen 9% und 18% in November bis Februar und 8% im März im Gesamtniveau um rund 10 Prozentpunkte niedriger. Beim Vergleich zwischen den Klonen fiel der Klon 126-2 als derjenige auf, der fast ausnahmslos zu jedem Erntetermin in jedem Jahr die höchste Kontaminationswerte aufwies.

Tab. 36 Einfluss des Reisererntetermins auf die Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung in den Jahren 1999/2000 (Serie 1) und 2000/2001 (Serie 2)

Vitalität T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

Vitalität T12: Vitalität 12 Wochen nach Präparation der Apices

Fett umrandet = erfolgreiche Varianten

Ernte-termin		Klon	Apices gesamt	Kontami- nation		Vitalität T4		Vitalität T12		Etablie- rung	
Monat	Jahr		n	n	%	n	%	n	%	n	%
Nov.	2000	126-1	20	3	15	0	0	0	0	0	0
	2000	126-2	20	7	35	0	0	0	0	0	0
	2000	126-3	20	1	5	0	0	0	0	0	0
Dez.	1999	126-1	20	0	0	12	60	1	5	0	0
	2000	126-1	20	1	5	18	90	0	0	0	0
	1999	126-2	20	6	30	8	40	2	10	0	0
	2000	126-2	20	6	30	15	75	0	0	0	0
	1999	126-3	20	12	60	1	5	0	0	0	0
	2000	126-3	20	2	10	19	95	2	10	2	10
Jan.	2000	126-1	20	1	5	18	90	18	90	0	0
	2001	126-1	18	4	22	8	44	0	0	0	0
	2000	126-2	21	11	52	15	71	15	71	0	0
	2001	126-2	20	4	20	15	75	7	35	7	35
	2000	126-3	24	7	29	20	83	24	100	0	0
	2001	126-3	20	1	5	15	75	2	10	0	0
Feb.	2000	126-1	20	6	30	3	15	0	0	0	0
	2001	126-1	20	2	10	5	25	0	0	0	0
	2000	126-2	20	11	55	7	35	0	0	0	0
	2001	126-2	20	5	25	10	50	0	0	0	0
	2000	126-3	20	3	15	5	25	0	0	0	0
	2001	126-3	20	3	15	13	65	0	0	0	0
März	2000	126-1	20	2	10	2	10	0	0	0	0
	2001	126-1	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	2000	126-2	20	5	25	7	35	0	0	0	0
	2001	126-2	20	5	25	0	0	0	0	0	0
	2000	126-3	20	2	10	14	70	0	0	0	0
	2001	126-3	20	0	0	1	5	0	0	0	0

Die Vitalität T4 nach 4-wöchiger in vitro Kultur zeigte im Winter 1999/2000 im Januar mit 82% einen deutlich höheren Wert als in den anderen Monaten, wo sie zwischen 25% und 38% lag. Dagegen lag im Winter 2000/2001 der höchste Wert von 87% im Dezember. In Januar und Februar sank die Vitalität T4 langsam ab und fiel im März auf 2%. Im November hatte sie Null betragen. Die einzelnen Klone verhielten sich sowohl zu den einzelnen Ernteterminen unterschiedlich als auch von Jahr zu Jahr mit Werten zwischen 0% und 95%. Die Unterschiede zwischen den Klonen waren gering. Der Klon 126-3 lag während des Winters 1999/2000, gemittelt über die Termine, mit 48% im Durchschnitt um 2 Prozentpunkte über

dem Klon 126-2, der wiederum um 2 Prozentpunkte über dem Klon 126-1 lag. Die Tendenz war im Winter 2000/2001 gleich, aber die Unterschiede waren größer und betrugen jeweils 8 Prozentpunkte zwischen den Klonen, mit dem besten Wert bei Klon 126-3 wie im Vorjahr.

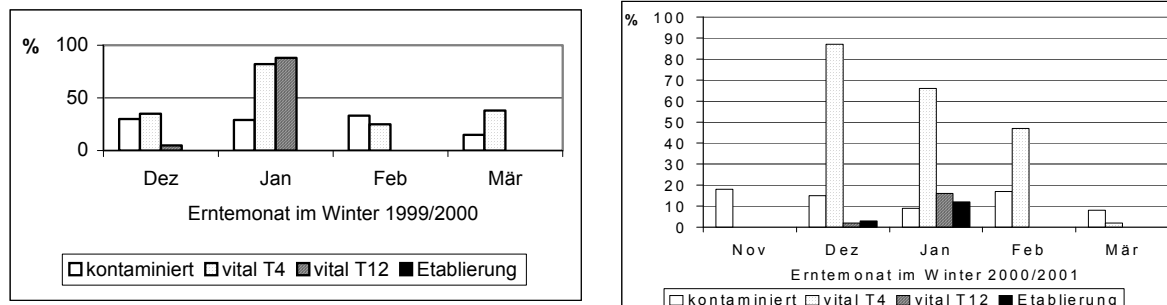


Abb. 18 a und 18 b Einfluss des Reisererntetermins auf die Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung im Winter 1999/2000 und im Winter 2000/2001. Ergebnisse von drei Klonen.

In Abbildung 19 ist der Vitalitätsverlauf, ausgedrückt durch die T4- und T12-Werte, ausgehend von 100% Vitalität vor der Kryokonservierung, dargestellt. In Serie 1 sind die Apices viel schneller und einheitlicher abgestorben als in Serie 2. Zwölf Wochen nach der Präparation war die Vitalitätsrate T12 in Serie 1 fast auf Null gesunken. Bei Erntetermin Januar lag T12 mit 88% über dem T4-Wert, da manche Apices, die zunächst nicht vital wirkten, später ergrüneten. Im zweiten Versuchsjahr gab es keinen so hohen Wert. Hier trat zwar auch der höchste Wert im Januar auf, aber er betrug nur 16%.

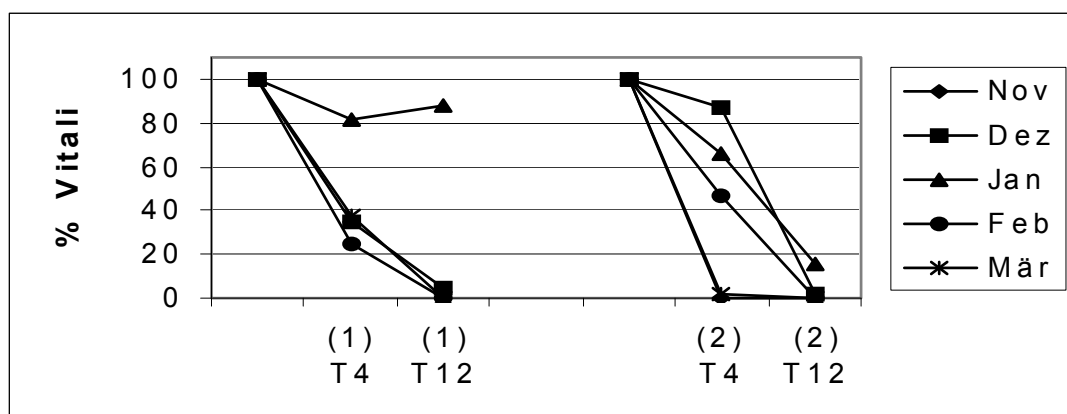


Abb. 19 Einfluss des Reisererntetermins auf die Vitalität von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen ohne Lagerung in 2 Serien. Ergebnisse von drei Klonen.

- (1) = 1. Serie (Winter 1999/2000)
 (2) = 2. Serie (Winter 2000/2001)
 T4 = Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices
 T12 = Vitalität 12 Wochen nach Präparation der Apices
 Legende: Reisererntetermine

Auf die Klone bezogen lagen die Vitalitätsraten T12 im 1. Versuchsjahr um ca. 20 Prozentpunkte unter der Vitalität T4 und wiesen Werte zwischen 21% und 29% auf. Im 2. Versuchsjahr war das Absinken gegenüber der Vitalität T4 ausgeprägter: Von Klon 126-1 lebte keine Knospe mehr, von den beiden anderen Klonen nur noch 7%, bzw. 3%. Insgesamt waren die Unterschiede in der Differenz zwischen Vitalität T12 und Vitalität T4 zwischen den Serien erheblich größer als zwischen den Klonen. Von den Ernteterminen wies Januar die höchsten T12-Werte auf. Das bedeutet, dass bei diesem Erntetermin die Knospen am längsten überlebten.

Im 1. Versuchsjahr, dem Winter 1999/2000, wurde keines der Explantate etabliert, während im Folgejahr sowohl bei Ernte im Dezember als auch im Januar Sprossbildung erfolgte. Dies waren im Dezember 3% und im Januar 12% der eingesetzten Explantate, was insgesamt gesehen das beste Ergebnis bei der Kryokonservierung von Winterknospen der Elsbeere war. Es gelangten beim ersten Termin 2 Knospen des Klons 126-3 zur Etablierung und beim zweiten Termin 7 Knospen des Klons 126-2. Beide hatten vorher niedrige T12 – Vitalitätsraten von 10%, bzw. 35% aufgewiesen.

3.2.3.2.2 Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung

Im 1. Versuchsjahr wurden die Kontaminationen durch die Reiserlagerung kaum verändert und lagen bei 30%. Im 2. Versuchsjahr waren sie, ebenfalls wie ohne Lagerung, niedriger als im 1. Versuchsjahr, aber mit dem Unterschied, dass der November-Wert und der Februar-Wert mit 23%, bzw. 30% relativ hoch blieben. Die Dezember-, Januar- und März-Werte waren sowohl gegenüber dem 1. Versuchsjahr als auch gegenüber den Werten ohne Lagerung erniedrigt. Die genotyp-bedingten Unterschiede waren nicht so hoch wie ohne Lagerung, aber in den meisten Fällen war auch hier der Klon 126-2 derjenige mit den höchsten Kontaminationsraten. Die Gesamt-Ergebnisse dieser Versuchsserie sind in den Abbildungen 20 a und b dargestellt, die Einzelergebnisse in Tabelle 37.

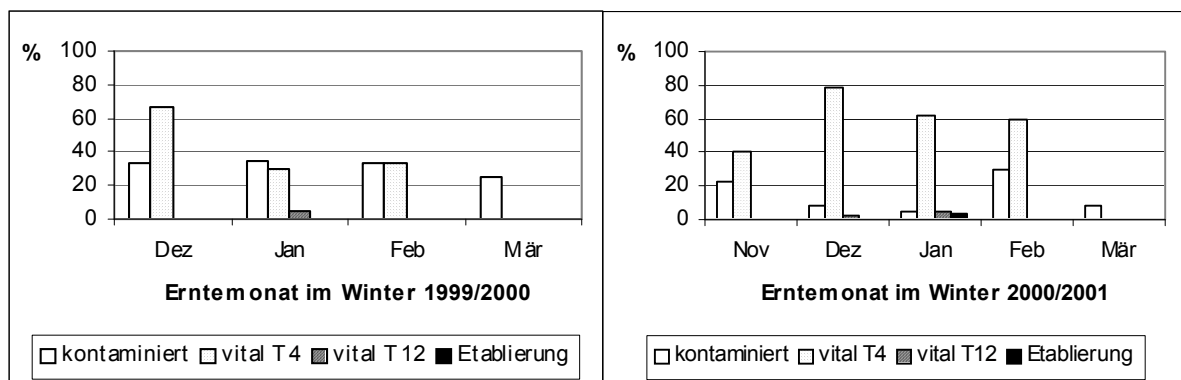


Abb. 20 a und 20 b Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Sorbus torminalis*- Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen im Winter 1999/2000 und im Winter 2000/2001. Ergebnisse von drei Klonen.

vital T4 = Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices
vital T12 = Vitalität 12 Wochen nach Präparation der Apices

Der Verlauf der Vitalitätsraten in den beiden Versuchsjahren ist in Abbildung 21 wiedergegeben. Die Vitalität T4 lag in beiden Jahren im Dezember mit 78% und 67% am höchsten. Sie sank im Winter 1999/2000 in Januar und Februar auf ca. 30%, während sie im Winter 2000/2001 mit 62% und 59% deutlich höher blieb. Im März betrug sie in beiden Jahren Null. Die Vitalität T12 war in beiden Versuchsjahren äußerst niedrig und nur zu den Terminen Dezember und Januar mit 2% und 5% größer als Null.

Tab. 37 Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf die Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen in den Jahren 1999/2000 (Serie 1) und 2000/2001 (Serie 2)

Vitalität T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

Vitalität T12: Vitalität 12 Wochen nach Präparation der Apices

Fett umrandet = erfolgreiche Variante

Erntetermin		Klon	Apices gesamt	Kontami- nation		Vitalität T4		Vitalität T12		Etablierung	
Monat	Jahr		n	n	%	n	%	n	%	n	%
Nov.	2000	126-1	20	4	20	6	30	0	0	0	0
	2000	126-2	20	8	40	10	50	0	0	0	0
	2000	126-3	20	2	10	8	40	0	0	0	0
Dez.	1999	126-1	20	0	0	7	35	0	0	0	0
	2000	126-1	20	2	10	12	60	0	0	0	0
	1999	126-2	20	8	40	14	70	0	0	0	0
	2000	126-2	20	3	15	17	85	0	0	0	0
	1999	126-3	20	12	60	19	95	0	0	0	0
	2000	126-3	20	0	0	18	90	1	5	0	0
Jan.	2000	126-1	20	5	25	7	35	1	5	0	0
	2001	126-1	20	0	0	12	60	1	5	0	0
	2000	126-2	20	10	50	6	30	0	0	0	0
	2001	126-2	20	1	5	14	70	1	5	0	0
	2000	126-3	20	6	30	5	25	2	10	0	0
	2001	126-3	18	2	11	10	56	1	6	2	11
Feb.	2000	126-1	20	4	20	6	30	0	0	0	0
	2001	126-1	20	9	45	6	30	0	0	0	0
	2000	126-2	20	12	60	6	30	0	0	0	0
	2001	126-2	19	6	32	13	68	0	0	0	0
	2000	126-3	20	4	20	8	40	0	0	0	0
	2001	126-3	17	2	12	14	82	0	0	0	0
März	2000	126-1	20	4	20	0	0	0	0	0	0
	2001	126-1	20	3	15	0	0	0	0	0	0
	2000	126-2	20	8	40	0	0	0	0	0	0
	2001	126-2	20	2	10	0	0	0	0	0	0
	2000	126-3	20	3	15	0	0	0	0	0	0
	2001	126-3	20	0	0	0	0	0	0	0	0

Der Genotyp mit den höchsten Vitalitätsraten bei beiden Serien war, wie ohne Reiserlagerung, der Klon 126-3. Seine T4-Werte lagen mit rund 40% kaum niedriger als ohne Lagerung, jedoch mit ca. 2% nach 12 Wochen in beiden Versuchsjahren viel niedriger als ohne Lagerung. Die beiden anderen Klone waren im Winter 1999/2000 schon beim T4-Wert mit 25%, bzw. 33% deutlich niedriger als ohne Lagerung. Im Winter 2000/2001 lagen sie mit 30% und 44% fast genauso hoch wie ohne Lagerung. Acht Wochen später zeigten die 1% oder 0% Vitalität T12, dass diese Versuchsvarianten erfolglos waren. Damit zeigten sich, ebenso wie bei den Versuchen ohne Reiserlagerung, die langsamsten Absterberaten bei Ernte im Januar, aber auf einem niedrigeren Niveau.

Die einzige Etablierung erfolgte nach der Ernte Januar im Winter 2000/2001 bei Klon 126-3 mit 2 Apices. Es gab damit weder Parallelen zur Sprossbildung ohne Lagerung noch zu den Reaktionen von Wildbirne.

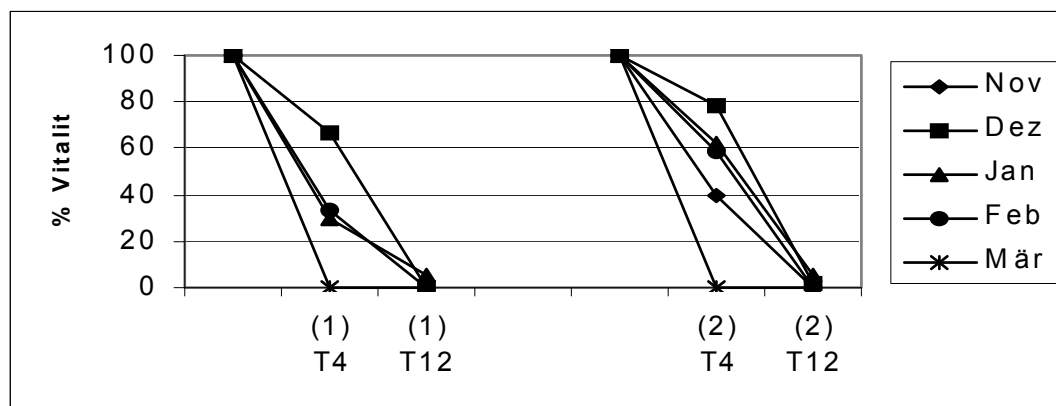


Abb. 21 Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf die Vitalität von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen in 2 Serien. Ergebnisse von drei Klonen.

(1) = 1. Serie (Winter 1999/2000)
 (2) = 2. Serie (Winter 2000/2001)
 T4 = Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices
 T12 = Vitalität 12 Wochen nach Präparation der Apices
 Legende: Reisererntetermine

3.2.3.3. Nachbehandlungen nach dem Auftauen

In den oben geschilderten Versuchen wurden teilweise recht hohe Vitalitäts-Werte festgestellt, denen aber fast keine Etablierungen folgten. Daher sollte geprüft werden, ob Unterschiede in der Nachbehandlung der Apices nach der Kryokonservierung einen positiven Effekt haben würden. Einen Überblick über diese Versuche und die Ergebnisse gibt Tabelle 38.

Das Versuchsmaterial entsprach dem Versuch „Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung“ in der Variante „Erntetermin Februar“ des Winters 1999/2000. Die Vielzahl der Faktoren hatte Vorrang vor dem Umfang der Versuche, bzw. der Anzahl eingesetzter Explantate. Nur die Etablierungen werden vorgestellt, da sie die wichtigsten Ergebnisse sind. Die Parameter Kontaminationen und Vitalität lagen auf vergleichbarem Niveau wie oben bereits geschildert.

3.2.3.3.1 Dunkelphase kombiniert mit verschiedenen Auftautemperaturen

Die Knospen wurden bei -5° , $+4^{\circ}$ und $+22^{\circ}\text{C}$ aufgetaut. Nach der Präparation wurden die Apices in den Klimaraum gestellt und entweder standardmäßig belichtet oder für zwei Wochen völlig dunkel gehalten und dann in die standardmäßige Belichtung gestellt. Die Etablierung war mit 10 von 197 präparierten Apices, entsprechend 5%, besser als in dem Versuch „Erntetermin und Lagerung“. Bei Betrachtung der einzelnen Faktoren lässt sich kein eindeutig positiver Effekt von Licht oder Dunkelheit feststellen. Die Auftautemperatur könnte einen Einfluss haben, da bei $+22^{\circ}\text{C}$ 6 Explantate regenerierten während es bei den anderen Temperaturen nur jeweils 2 waren. Bedeutsamer war jedoch der Einfluss des Genotyps, da 6 von 10 etablierten Explantaten vom Klon 126-2 stammten und von den beiden anderen Klone jeweils 2 (Tabelle 38).

3.2.3.3.2 Aktivkohle im Nährmedium

Der Einfluss von 2 g/l Aktivkohle im Etablierungsmedium 2/11 wurde bei den Auftautemperaturen $+4^{\circ}\text{C}$ und $+22^{\circ}\text{C}$ geprüft. Ab dem ersten Transfer nach 4 Wochen wurde keine Aktivkohle mehr verwendet. Bei beiden Auftautemperaturen wurden je zwei Apices des Klons 126-2 sowohl auf dem Medium mit Aktivkohle als auch auf dem Kontrollmedium ohne Aktivkohle etabliert. Die anderen Klone entwickelten kein Sprosswachstum. Die Aktivkohle hat also die Etablierung nicht gefördert. Wie bei dem Versuch „Dunkelphase“ war 22°C die günstigere Auftautemperatur: Die zwei bei $+22^{\circ}\text{C}$ etablierten Apices stammten aus einer Grundmenge von 9 präparierten Apices (entsprechend 22% Etablierung), während die zwei regenerierenden Knospen bei $+4^{\circ}\text{C}$ aus der mehr als doppelt so großen Grundmenge von 20 Apices kamen (entsprechend 10% Etablierung) (Tabelle 38).

3.2.3.3.3 Agarose

Nach Auftauen bei $+4^{\circ}\text{C}$ wurden die als besonders empfindlich geltenden frisch präparierten Apices nicht auf dem standardmäßig mit Agar verfestigten Nährmedium platziert, sondern auf einen Agarosetropfen in der Petrischale, der mit Flüssigmedium umgeben wurde. Nach 4 Wochen wurden die Explantate auf standardmäßig mit Agar verfestigtes 2/11-Medium umgesetzt. Es erfolgte jedoch keinerlei Sprosswachstum. Da bei Verwendung von festem 2/11-Medium ebenso wie bei 2/11-Medium mit Aktivkohle bei dieser Temperatur zumindest der Klon 126-2 etabliert werden konnte (siehe oben), wurde die fehlende Etablierung einem negativen, oder zumindest fehlendem positiven Einfluss des Agarosetropfens, und nicht der Temperatur, zugeschrieben (Tabelle 38).

3.2.3.3.4 Gibberellinsäure GA_3

Dem Grundmedium 2/11 wurde Gibberellinsäure (GA_3) in den Konzentrationen 0,1, 1,0 und 5,0 mg/l zugesetzt. Die Auftautemperatur betrug 22°C . Beim Umsetzen wurden die GA_3 -Zusätze beibehalten. Etablierung erfolgte nur bei einem Apex des Klons 126-2 auf dem Medium mit 1,0 mg/l GA_3 . Damit war kein positiver Einfluss der Gibberellinsäure erkennbar (Tabelle 38).

Tab. 38 Einfluss verschiedener Nachbehandlungen auf die Etablierung von *Sorbus torminalis*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen

präp. = Anzahl Apices präpariert
 etabliert = Anzahl Apices etabliert
 (1), (2), (3) = Versuchsserien 1, 2, 3

Auftautemperatur		+ 22°C						+ 4°C		- 5°C	
Behandlung	Klon	präp. (1)	etabliert (1)	präp. (2)	etabliert (2)	präp. (3)	etabliert (3)	präp.	etabliert	präp.	etabliert
Kontrolle	126-1	12	1	10	1	10	0	10	0	10	0
	126-2	11	2	9	0	10	0	10	2	10	1
	126-3	11	0	10	0	10	1	13	0	12	0
Dunkelphase	126-1	12	0					10	0	10	0
	126-2	10	2					10	0	10	1
	126-3	11	1					13	0	12	0
Aktivkohle	126-1	10	0					20	0		
	126-2	9	2					20	2		
	126-3	10	0					25	0		
Agarose	126-1							21	0		
	126-2							20	0		
	126-3							23	0		
GA ₃		0,1 mg/l		1,0 mg/l		5,0 mg/l					
	126-1	10	0	10	0	10	0				
	126-2	10	0	10	1	10	0				
	126-3	10	0	10	0	10	0				

Wie die wechselnden Ergebnisse bei den Präparationen 1, 2 und 3 der Kontrolle zeigen, ist die Wiederholbarkeit bei diesen Versuchsumfängen problematisch. Wenn man jedoch die Häufigkeiten betrachtet, mit denen die einzelnen Klone, unabhängig von anderen Einflussfaktoren als der Auftautemperatur, Etablierung zeigten, darf bei aller Vorsicht geschlossen werden, dass die Auftautemperatur, entgegen der Annahmen nach den in Kap. 3.2.3.1. geschilderten Ergebnissen, einen Einfluss hat. Die Klone 126-1 und 126-3 zeigten ausschließlich bei + 22°C Auftautemperatur Sprosswachstum. Von den über alle Versuche zusammengekommenen 16 etablierten Apices hatten 11 die Auftautemperatur + 22°C erfahren. Auch der Einfluss des Genotyps war groß: Von 16 etablierten Apices gehörten 13 zu dem Klon 126-2. Von den anderen geprüften Faktoren verbesserte keiner das Ergebnis gegenüber der Kontrolle (Tabelle 38).

3.2.4. Kryokonservierung von *Prunus avium*-Winterknospen

Bei dem Kryokonservierungsversuch „Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung“ wurde im Winter 1999/2000 *Prunus avium* modellhaft mitbearbeitet. Der Versuchsaufbau entsprach dem von *Pyrus pyrausta* und *Sorbus torminalis*. Die Prüfung der Vitalität vor und nach der Kryokonservierung erfolgte ebenfalls im TTC-Test (Abbildungen 36 a und b im Anhang). Die Variante „Erntetermin Januar ohne Reiserlagerung“ konnte nicht durchgeführt werden, und die TTC-Tests der Varianten „Erntetermin Dezember und März mit Lagerung“ ebenfalls nicht. Letztere aus Materialmangel und erstere aufgrund von Fehlern bei der Bearbeitung des Materials.

3.2.4.1. Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung

3.2.4.1.1 Kryokonservierung der Winterknospen ohne Reiserlagerung

Die Kontaminationen waren im Dezember mit einem Durchschnitt von 2% auffällig niedrig. Bei Ernte im Februar fiel der Klon 247-4 mit dem sehr hohen Wert von 55% auf. Die beiden anderen Klone ebenso wie alle Kontaminationswerte im März lagen im Bereich zwischen 15% und 30%.

Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 39 dargestellt und die Gesamtergebnisse in der Abbildung 22.

Tab. 39 Einfluss des Reisererntetermins ohne Lagerung auf Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Prunus avium*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen im Winter 1999/2000.

Vitalität TTC: Vitalität im TTC-Test

Vitalität T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

x = nicht durchgeführt

Erntetermin		Klon	Vitalität TTC	Apices gesamt	Kontamination		Vitalität T4		Etablierung	
Monat	Jahr		%	n	n	%	n	%	n	%
Dez.	1999	247-4	76	20	1	5	19	95	0	0
	1999	247-24	93	20	0	0	20	100	0	0
	1999	247-28	85	20	0	0	20	100	0	0
Jan.	2000	247-4	52	x	x	x	x	x	x	x
	2000	247-24	68	x	x	x	x	x	x	x
	2000	247-28	75	x	x	x	x	x	x	x
Feb.	2000	247-4	95	20	11	55	0	0	0	0
	2000	247-24	40	20	6	30	0	0	0	0
	2000	247-28	100	20	3	15	6	30	0	0
März	2000	247-4	65	20	5	25	0	0	0	0
	2000	247-24	90	20	3	15	0	0	0	0
	2000	247-28	85	20	4	20	0	0	0	0

Die Vitalitätswerte im TTC-Test variierten etwas zwischen den Ernteterminen. Sie lagen im Januar mit 65% am niedrigsten und in den anderen Monaten zwischen 75% und 80. Die

Unterschiede zwischen den Klonen betrugen in Dezember, Januar und März bis zu ca. 20 Prozentpunkte (zwischen höchstem und niedrigstem Wert), wobei der Klon 247-4 immer den niedrigsten Wert aufwies. Zum Erntetermin Februar verhielten sich die Klone anders. Der Klon 247-4 wies mit 95% nicht nur den zweithöchsten Wert zu diesem Termin auf, sondern dies war der zweithöchste Wert in der ganzen Serie, nur übertroffen von 100% Vitalität des Klons 247-28 im Februar. In starkem Kontrast dazu stehen die 40% Vitalität des Klons 247-24, der sich hier extrem deutlich von den beiden anderen Klonen unterscheidet und gleichzeitig den niedrigsten Wert der Serie darstellt.

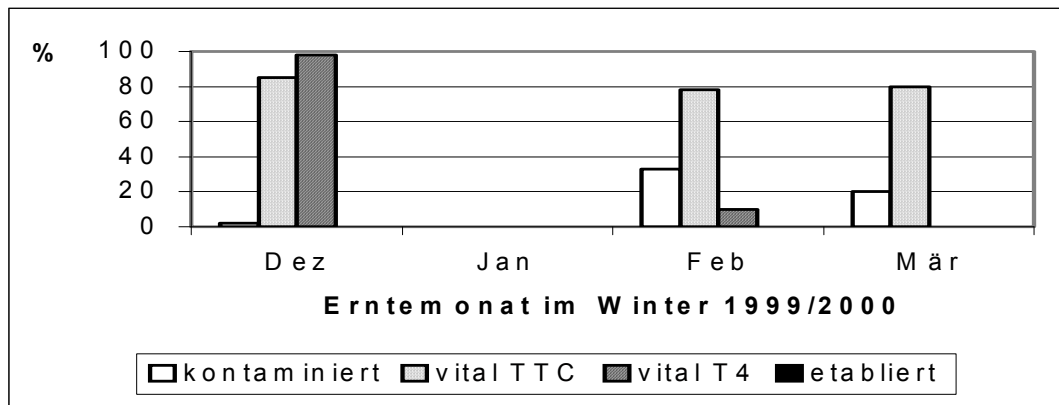


Abb. 22 Einfluss des Reisererntetermins ohne Lagerung auf Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Prunus avium*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen im Winter 1999/2000. Ergebnisse von drei Klonen.

vital TTC: Vitalität im TTC-Test

vital T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

etabliert: Sprosswachstum in vitro

Die Vitalität T4 nach vierwöchiger in vitro Kultur spiegelt diese Verhältnisse nicht wieder. Sie liegt im Dezember mit 98% sogar noch über dem TTC-Wert. Bei den Ernten im Februar und März sinkt sie auf Null ab. Eine Ausnahme bildet der Klon 247-28, der im Februar noch zu 30% vital war.

Eine Etablierung erfolgte bei keiner der Varianten.

3.2.4.1.2 Kryokonservierung der Winterknospen nach Reiserlagerung

Nach der Reiserlagerung traten im Dezember und Februar um ca. 30 Prozentpunkte höhere Kontaminationen auf als ohne Lagerung. Die März-Werte blieben beinahe unverändert. Für den Erntetermin Januar liegt kein Vergleichswert ohne Lagerung vor, aber mit 6% ist diese Kontaminationsrate erheblich niedriger als die der anderen Erntetermine nach Lagerung. Das Ausmaß der Erhöhung war bei den einzelnen Klonen uneinheitlich. Am stärksten nahmen die Kontaminationen bei dem Klon 247-28 zu und betrugen insgesamt 41%, während sie bei diesem Klon ohne Lagerung mit 12% am niedrigsten von allen Klonen gewesen waren.

Die Einzelergebnisse sind in Tabelle 40 dargestellt und die Gesamtergebnisse in der Abbildung 23.

Die Vitalität im TTC-Test, die nur im Dezember und Februar bestimmt werden konnte, lag im Dezember mit 60% etwas niedriger als ohne Lagerung (85%). Im Februar lagen die ermittelten 33% erheblich unter den 78% ohne Lagerung, wobei sich die absteigende Reihenfolge der Klone mit 247-28 als dem besten und 247-24 als dem schlechtesten wiederholte.

Tab. 40 Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Prunus avium*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen im Winter 1999/2000.

Vitalität TTC: Vitalität im TTC-Test

Vitalität T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

Etablierung: Sprosswachstum in vitro

x = nicht durchgeführt

Erntetermin		Klon	Vitalität TTC	Apices gesamt	Kontamination		Vitalität T4		Etablierung	
Monat	Jahr		%	n	n	%	n	%	n	%
Dez.	1999	247-4	55	19	4	21	0	0	0	0
	1999	247-24	30	20	4	20	0	0	0	0
	1999	247-28	95	20	11	55	0	0	0	0
Jan.	2000	247-4	x	20	2	10	3	15	0	0
	2000	247-24	x	24	1	4	0	0	0	0
	2000	247-28	x	20	1	5	8	40	0	0
Feb.	2000	247-4	35	20	8	40	0	0	0	0
	2000	247-24	0	20	15	75	0	0	0	0
	2000	247-28	65	20	14	70	0	0	0	0
März	2000	247-4	x	20	3	15	0	0	0	0
	2000	247-24	x	20	5	25	0	0	0	0
	2000	247-28	x	20	7	35	0	0	0	0

Vier Wochen nach der Präparation für die in vitro Kultur waren alle Apices der Erntetermine Dezember, Februar und März abgestorben, was besonders beim Erntetermin Dezember ein erheblicher Unterschied zu dem Verhalten der Apices ohne Lagerung war (Vitalität T4: 98%). Vom Erntetermin Januar lebten noch 3 Apices des Klons 247-4 und 8 des Klons 247-28, was für den T4-Vitalitätswert einen Durchschnitt von 17% ergab. Später starben auch diese Apices ab, so dass keine Etablierung gelang.

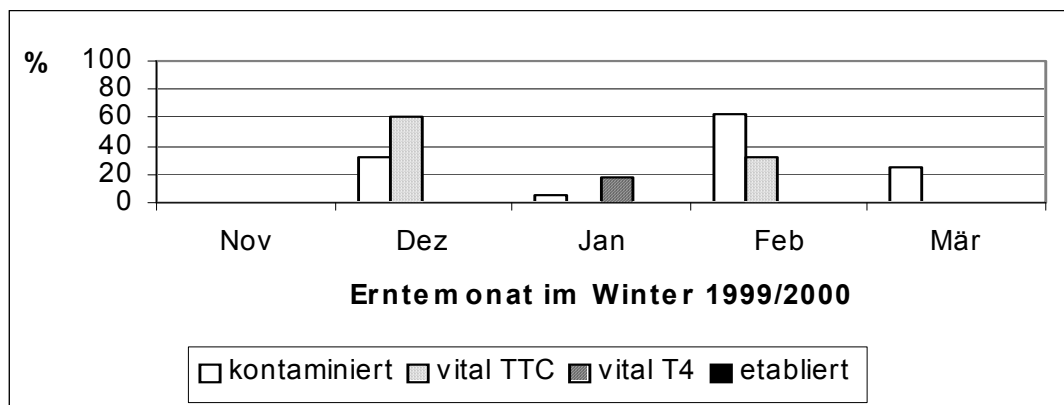


Abb. 23 Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung auf Kontamination, Vitalität und Etablierung von *Prunus avium*-Apices nach Kryokonservierung der Winterknospen im Winter 1999/2000. Ergebnisse von drei Klonen.

vital TTC: Vitalität im TTC-Test

vital T4: Vitalität 4 Wochen nach Präparation der Apices

etabliert: Sprosswachstum in vitro

In diesem Versuch wurde hohe Vitalität sowohl im TTC-Test als auch in vitro bei Ernte im Dezember ohne Reiserlagerung gefunden. Eine Sprossregeneration gelang jedoch nicht. Im weiteren Verlauf der in vitro Kultur verhielten sich manchen Varianten der Vogelkirsche ähnlich wie Elsbeere: Die anfänglich grünen Apices begannen mit der Blattentfaltung, stagnierten dann und fingen sehr langsam an zu verbräunen bis sie schließlich als tot betrachtet werden mussten. Dieser Prozess zog sich bei *Prunus avium* bis zu drei Monate hin.

3.3. In vitro Kultur nach Kryokonservierung

3.3.1. Vermehrung von *Pyrus pyraeaster*

Für das Studium des Verhaltens der aus kryokonservierten Winterknospen hervorgegangenen Sprosskulturen standen zwei Gruppen zur Verfügung. Sie werden als „post cryo–Gruppe 1“ und „post cryo–Gruppe 2“ bezeichnet.

- **post cryo–Gruppe 1:** Sprosskulturen aus dem in Kapitel 3.2.2.2. beschriebenen Versuch „Einfluss von Genotyp und Individuum“: 4 Klone mit 6 Individuen, aufgeführt in Tabelle 41.
- **post cryo–Gruppe 2:** Sprosskulturen aus dem in Kapitel 3.2.2.3. beschriebenen Versuch „Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung“ des Winters 1999/2000 mit folgenden Behandlungsvarianten:
 Behandlung 1: Ernte Dezember, ohne Reiserlagerung, Klon 95-14
 Behandlung 2: Ernte Dezember, mit Reiserlagerung, Klon 95-12
 Behandlung 3: Ernte Januar, mit Reiserlagerung, Klon 95-1
 Behandlung 4: Ernte Januar, mit Reiserlagerung, Klon 95-12
 Behandlung 5: Ernte Januar, mit Reiserlagerung, Klon 95-14.

Beide Gruppen wurden standardmäßig in Weckgläsern auf den Medien 87/6, bzw. 87/27 vermehrt. Die Vermehrungskoeffizienten aus mindestens zwei Gläsern pro Klon mit je 12 bis 15 Sprossen wurden über 4, bzw. 6 Transfers ermittelt.

Die Ergebnisse der post cryo-Gruppe 1 sind in Tabelle 41 dargestellt. Die Vermehrungskoeffizienten lagen im Mittel zwischen 1,6 und 2,3 je Klon. Die Durchschnittswerte über alle Klone der einzelnen Transfers lagen zwischen 1,7 und 2,4. Es traten weder ungewöhnlich hohe noch ungewöhnlich niedrige Vermehrungskoeffizienten auf. Die bereits bei der Etablierung festgestellten Unterschiede zwischen den verschiedenen Individuen innerhalb des Klons Rein 0-5 finden sich auch hier: Die Durchschnittswerte betragen 1,9, 2,3 und 2,1. Die Einzelwerte eines einzelnen Transfers lagen um bis zu 0,8 auseinander (Beispiel: Transfer 2) und waren damit genauso weit auseinander wie zwischen verschiedenen Klonen (Beispiel: Transfer 2, Klone STO 59-1 und Rein 0-5 a).

Die Ergebnisse der post cryo-Gruppe 2 sind in Tabelle 42 aufgeführt. Die durchschnittlichen Vermehrungskoeffizienten der vier Transfers lagen zwischen 1,4 und 2,1. Die durchschnittlichen Vermehrungskoeffizienten der Klone lagen mit Werten zwischen 1,4 und 2,6 in einem ähnlichen Bereich wie die der post cryo-Gruppe 1.

Auffällig sind die ersten drei Transfers des Klons 95-12 in der Behandlung 2 (Ernte im Dezember mit Reiserlagerung), die mit Werten um 3 sich von allen anderen Einzelwerten, die im Bereich zwischen 1,1 und 2,4 liegen, unterscheiden. Derselbe Klon weist bei Behandlung 4 (Ernte im Januar mit Reiserlagerung) nur beim ersten Transfer noch einen hohen Wert von 2,4 auf und bei den folgenden Transfers liegt er mit ca. 1,5 im gleichen Bereich wie die anderen Klone. Der Klon 95-12 weist also einmal einen durchschnittlichen Vermehrungskoeffizient von 2,6 auf (Behandlung 2) und einmal einen von 1,8 (Behandlung 4).

Auch bei Klon 95-14 gibt es Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten. Ein Vermehrungskoeffizient beträgt 1,4 (Behandlung 1), ein anderer beträgt 1,8 (Behandlung 5).

Tab. 41 Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyraster* nach Etablierung aus kryokonservierten Winterknospen. Einzelergebnisse von 6 Individuen der post cryo-Gruppe 1.

Tr. = Transfer
xq = Mittelwert

Klon- Nummer	Vermehrungskoeffizienten						
	Tr. 1	Tr. 2	Tr. 3	Tr. 4	Tr. 5	Tr. 6	xq
STO 59-1	2,0	2,0	1,9	1,7	1,8	2,4	2,0
STO 59-2	2,0	1,8	1,5	1,5	1,9	2,2	1,8
Rein 0-2	2,4	1,4	1,7	1,3	1,6	1,9	1,6
Rein 0-5 a	2,0	1,2	1,9	1,6	1,9	2,1	1,9
Rein 0-5 b	1,5	1,7	2,0	2,3	2,1	2,9	2,3
Rein 0-5 c	1,5	2,0	1,8	2,1	1,9	2,7	2,1
xq	1,9	1,7	1,8	1,8	1,9	2,4	2,0

Tab. 42 Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyraaster* nach Etablierung aus kryokonservierten Winterknospen. Einzelergebnisse von 3 Klonen der post cryo-Gruppe 2.

Tr. = Transfer
 xq = Mittelwert
 n.b. = nicht bestimmt

Reisererntetermin und Behandlung	Klon- Nummer	Vermehrungskoeffizienten				
		Tr.1	Tr. 2	Tr. 3	Tr. 4	xq
Dezember, ohne Lagerung	95-14	1,8	1,5	1,2	1,0	1,4
Dezember, mit Lagerung	95-12	2,8	3,1	3,2	1,4	2,6
Januar, ohne Lagerung	95-1	1,6	1,5	1,1	1,4	1,4
Januar, mit Lagerung	95-12	2,4	1,5	n.b.	1,6	1,8
Januar, mit Lagerung	95-14	2,0	1,9	1,5	1,9	1,8
	xq	2,1	1,9	1,7	1,4	1,8

3.3.2. Bewurzelung und Akklimatisierung von *Pyrus pyraaster*

post cryo – Gruppe 1

Die Bewurzelung erfolgte bei den Temperaturregimen 24°/20°C und 20°/15°C. Es wurden die drei Bewurzelungsmedien 90/05, 90/07 und 90/09 verwendet, die sich hinsichtlich der Wachstumsregulatoren unterscheiden. Das Medium 90/07 war als einziges nicht mit Graphit dunkel gefärbt. Die verwendeten Klone mit den Bewurzelungs- und Akklimatisierungsergebnissen sind in Tabelle 43 dargestellt. Das Topfen der akklimatisierten Pflanzen erfolgte zwei bis drei Monate nach dem Pikieren.

Die Medien 90/05 und 90/09 führten bei dem niedrigeren Temperaturregime von 20°/15°C zu höheren Akklimatisierungswerten als bei den höheren Bewurzelungstemperaturen. Die Erhöhung war auf Medium 90/05 stärker ausgeprägt als auf dem Medium 90/09. Die Akklimatisierung von 30% auf Medium 90/05 wurde auf Medium 90/07 übertroffen (48%). Die Akklimatisierungsergebnisse standen in keinem offensichtlichen Verhältnis zu den Bewurzelungsergebnissen. Bei 2 Varianten (20/15°C, Medien 90/07 und 90/09) betrug die Bewurzelung 0%, aber die Akklimatisierungsrate lag dennoch bei 48%, bzw. 17%. Hier war in erheblichem Maß ex vitro Bewurzelung eingetreten.

Tab. 43 Bewurzelung und Abhärtung von *Pyrus pyrausta* – Sprosskulturen aus kryokonservierten Winterknospen. Einzelergebnisse der post cryo-Gruppe 1.

Zusammensetzung der Medien:

Medium 90/05 1,0 mg/l IBA, 4 g/l Graphit

Medium 90/07 0,1 mg/l IBA, kein Graphit

Medium 90/09 0,5 mg/l IBA, 0,5 mg/l NAA, 4 g/l Graphit

Temperatur Medium	Klon- nummer	Anzahl gesamt	Anzahl bewurzelt	% bewurzelt	Anzahl akklimatisiert	% akklimatisiert
24°/20°C 90/05	Rein 0-2	42	8	19	2	5
	Rein 0-5 a	34	15	44	2	6
	Rein 0-5 c	9	0	0	0	0
	STO 59-2	36	5	14	7	19
	Gött 80-20	6	4	67	3	50
	Gesamt	127	32	25	14	11
20°/15°C 90/05	Rein 0-2	28	7	25	13	46
	Rein 0-5 a	98	34	35	24	25
	Rein 0-5 b	55	27	49	13	24
	Rein 0-5 c	37	13	35	8	22
	STO 59-1	39	3	8	18	46
	STO 59-2	48	11	23	16	33
	Gesamt	305	95	31	92	30
20°/15°C 90/07	Rein 0-5 b	16	0	0	3	19
	Rein 0-5 c	16	0	0	12	75
	STO 59-2	16	0	0	8	50
	Gesamt	48	0	0	23	48
24°/20°C 90/09	Rein 0-2	31	11	36	4	13
	Rein 0-5 a	33	4	12	0	0
	STO 59-2	46	7	15	9	20
	Gesamt	110	22	20	13	12
20°/15°C 90/09	Rein 0-5 a	16	0	0	6	38
	Rein 0-5 b	16	0	0	0	0
	STO 59-2	16	0	0	2	13
	Gesamt	48	0	0	8	17

post cryo – Gruppe 2

Die Mikrostecklinge wurden bei 20°/15°C wurzelinduziert und nach vier Wochen pikiert. Von insgesamt 703 Mikrostecklingen waren 11% (74 Stück) bewurzelt. Das Topfen der akklimatisierten Pflanzen erfolgte 2 bis 3 Monate nach dem Pikieren. 17% (118 Stück) konnten getopft und somit als akklimatisiert bonitiert werden. Dabei traten erhebliche Unterschiede auf: Der Klon 95-14, hervorgegangen aus Reiserernte im Januar ohne Lagerung, wies mit 44% die höchste Anzahl akklimatisierter Pflanzen auf. Die Mikrostecklinge des Klons 95-12 aus der gleichen Reiserernte mit Lagerung waren zu 16% akklimatisiert, während es bei den Mikrostecklingen dieses Klons aus der Reiserernte Februar mit Lagerung weder zur Bewurzelung noch zum Anwachsen in Erde kam und daher die Akklimatisierung 0% betrug (Tabelle 44).

Tab. 44 Bewurzelung und Abhärtung von *Pyrus pyraster* – Sprosskulturen aus kryokonservierten Winterknospen. Einzelergebnisse der post cryo-Gruppe 2.

Reiserernte-termin und Behandlung	Klon	Anzahl gesamt	Anzahl bewurzelt	% bewurzelt	Anzahl akklimatisiert	% akklimatisiert
Januar, ohne Lagerung	95-14	32	14	44	14	44
Januar, mit Lagerung	95-12	646	60	9	104	16
Februar, mit Lagerung	95-12	25	0	0	0	0
	Gesamt	703	74	11	118	17

3.4. Einfluss der Kryokonservierung von *Pyrus pyraster* – Winterknospen auf die in vitro Kultur: Vergleich der Versuchsgruppen sine cryo und post cryo

In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die Kryokonservierung einen Einfluss auf die in vitro Kultur hat. Dafür werden die Daten, die in den vorherigen Kapiteln dargestellt und erläutert wurden, noch einmal aufgegriffen und direkt nebeneinander gestellt. Dies wird nur für Wildbirne durchgeführt, weil es mit Elsbeere nur wenige Etablierungen gab und daher das Datenmaterial über Vermehrungskoeffizienten, Bewurzelung und Akklimatisierung zu gering für einen Vergleich ist.

Definition sine cryo: Pflanzenmaterial, das zu keiner Zeit kryokonserviert war.

Definition post cryo: Pflanzenmaterial, das nach Kryokonservierung gewachsen ist.

Im Folgenden werden die in den vorangegangenen Kapiteln geschilderten Einzelergebnisse von Material nach Kryokonservierung ("post cryo") und Material ohne vorausgegangene Kryokonservierung ("sine cryo") zusammengestellt. Um die Gruppen zu charakterisieren, werden folgende Synonyme verwendet:

Versuchsgruppe „WiKn sine cryo“	Winterknospen von 12 Klonen aus dem Versuch „Evaluierung unterschiedlicher Explantatquellen“ (Kapitel 3.1.1.1.)
Versuchsgruppe „grün sine cryo“	grüne Knospen von Pflöpfingen aus dem Versuch „Evaluierung unterschiedlicher Explantatquellen“ (Kapitel 3.1.1.2.)
Versuchsgruppe „Termin sine cryo“	Winterknospen aus dem Versuch „Erntetermin und Lagerung“ (Kapitel 3.1.4.)
Versuchsgruppe „post cryo-Gruppe 1“	Winterknospen aus dem Versuch „Einfluss von Genotyp und Individuum“ (Kapitel 3.2.2.2. und 3.3.)
Versuchsgruppe „post cryo-Gruppe 2“	Winterknospen aus dem Versuch „Erntetermin und Lagerung“ (Kapitel 3.2.2.3. und 3.3.)

3.4.1. Etablierung

Im direkten Vergleich der verschiedenen Behandlungsvarianten der beiden Versuchsgruppen „Termin sine cryo“ und „Post cryo-Gruppe 2“ lässt sich feststellen: Die Etablierung post cryo war stark vom Erntemonat der Reiser abhängig. In den Monaten Februar und März, in denen die besten Etablierungsraten, vor allem mit Lagerung der Reiser, ohne Kryokonservierung erzielt wurden, fanden keine Etablierungen nach Kryokonservierung statt. Den Vergleich der für die post cryo erfolgreichen Erntemonate November, Dezember und Januar zu den Etablierungen sine cryo zeigt Tabelle 45.

Tab. 45 Einfluss der Kryokonservierung auf die Etablierungen (%) von Apices aus Winterknospen von *Pyrus pyraster*. Ergebnisse von drei Klonen bei verschiedenen Reiserernteterminen und Reiserlagerung.

sine cryo = Versuchsgruppe „Termin sine cryo“

post cryo = Versuchsgruppe „post cryo-Gruppe 2“

oL 1, oL 2 = ohne Lagerung der Reiser in Versuchsjahr 1, bzw. 2

mL 1, mL 2 = mit Lagerung der Reiser in Versuchsjahr 1, bzw. 2

xq = Mittelwert

Erntetermin	November		Dezember		Januar	
Behandlung	sine cryo	post cryo	sine cryo	post cryo	sine cryo	post cryo
oL 1	-	-	0	7	3	0
oL 2	3	0	1	0	6	12
mL 1	-	-	0	7	5	35
mL 2	5	5	9	0	3	0
xq	4	3	3	4	4	12

Die höchsten Etablierungsraten wurden post cryo mit Erntetermin Januar ohne und mit Lagerung erzielt (12 und 35%). Die Ergebnisse sine cryo wurden deutlich übertroffen (6 und 5%). Weitere deutliche Unterschiede zwischen sine und post cryo sind nicht erkennbar.

Abbildung 24 zeigt einen Vergleich aller im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Etablierungsdaten für Wildbirne. Die drei Versuchsgruppen ohne Kryokonservierung weisen Etablierungswerte zwischen 3% und 14% auf, die zwei Versuchsgruppen mit Kryokonservierung liegen mit 4% und 7% im gleichen Bereich. Die Kontaminationsraten

liegen bei den drei Versuchsgruppen ohne Kryokonservierung zwischen 5% und 29%, bei den zwei Versuchsgruppen mit Kryokonservierung betragen sie 19%, bzw. 22%. In der Gegenüberstellung der drei Gruppen sine cryo mit den zwei Gruppen post cryo kann keine Beeinflussung der Etablierung durch Kryokonservierung festgestellt werden.

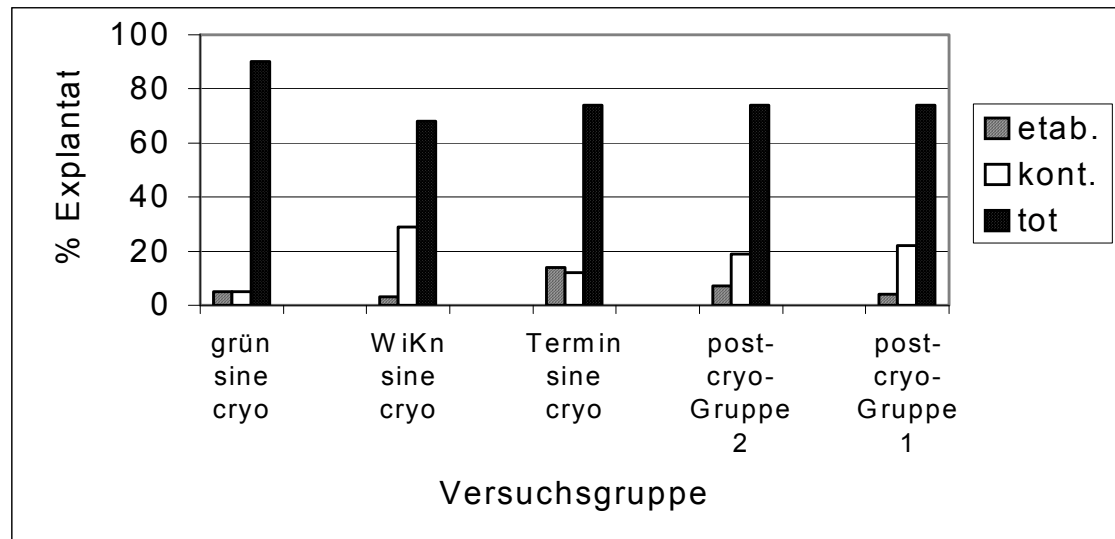


Abb. 24 Einfluss der Kryokonservierung auf die Etablierungen (%) von *Pyrus pyraster*. Ergebnisse von 3 Versuchsgruppen ohne Kryokonservierung (sine cryo) und 2 Versuchsgruppen mit Kryokonservierung (post-cryo)

Legende: etab = Prozent etablierter Apices, kont = Prozent kontaminierter Apices, tot = Prozent abgestorbener Apices.

Versuchsgruppen: Beschreibung siehe Anfang des Kapitels 3.4.

3.4.2. Vermehrung

Die Vermehrungskoeffizienten liegen nach Kryokonservierung in einem ähnlichen Bereich wie ohne Kryokonservierung. Die Pflanzen aus dem Versuch „Termin sine cryo“ weisen bei den ersten Transfers höhere Vermehrungsraten auf als die anderen Versuchsgruppen. Der 3. und 4. Transfer deuten einen Abwärtstrend an. Bei den post cryo-Gruppen „post-cryo-Gruppe 1“ und „post cryo-Gruppe 2“ zeichnet sich ein Aufwärtstrend ab. Eine eindeutige Beeinflussung der Vermehrungskoeffizienten durch Kryokonservierung ist nicht erkennbar (Abbildung 25).

3.4.3. Bewurzelung und Akklimatisierung

Die beste Bewurzelung und Akklimatisierung wurde in der Versuchsgruppe „WiKn sine cryo“ mit 38% erzielt. Die 2 anderen Gruppen sine cryo (grün sine cryo, Termin sine cryo) zeigten wesentlich niedrigere Akklimatisierungswerte von 14%, bzw. 11%. Im Vergleich dazu lagen die Ergebnisse der post cryo-Gruppen 1 und 2 mit 17% und 24% in einem mittleren Bereich (Abbildung 26).

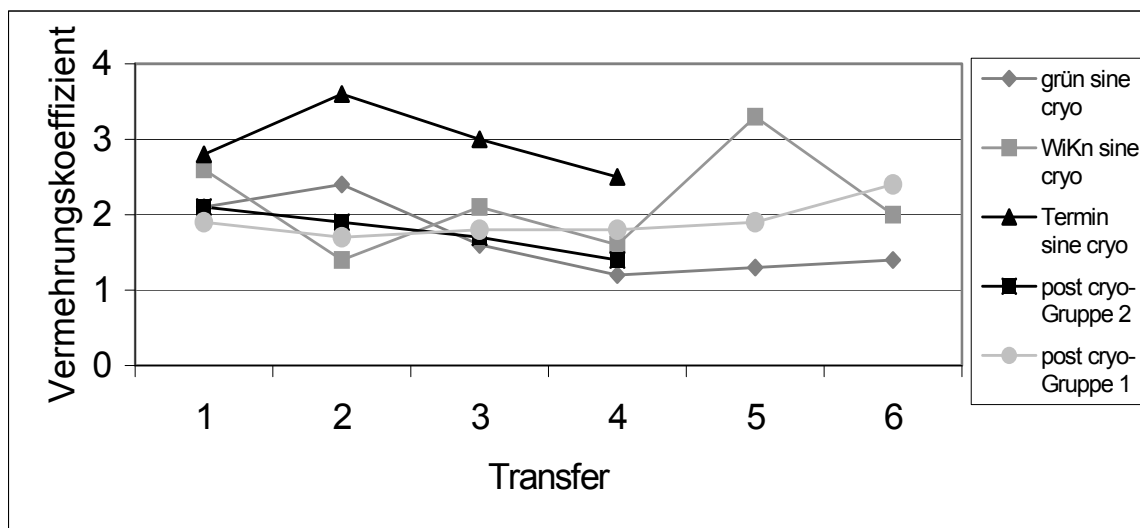


Abb. 25 Einfluss der Kryokonservierung auf die Vermehrungskoeffizienten von *Pyrus pyraester*. Ergebnisse über 6 Transfers von 3 Versuchsgruppen ohne Kryokonservierung (sine cryo) und 2 Versuchsgruppen mit Kryokonservierung (post cryo)

Versuchsgruppen: Beschreibung siehe Anfang des Kapitels 3.4.

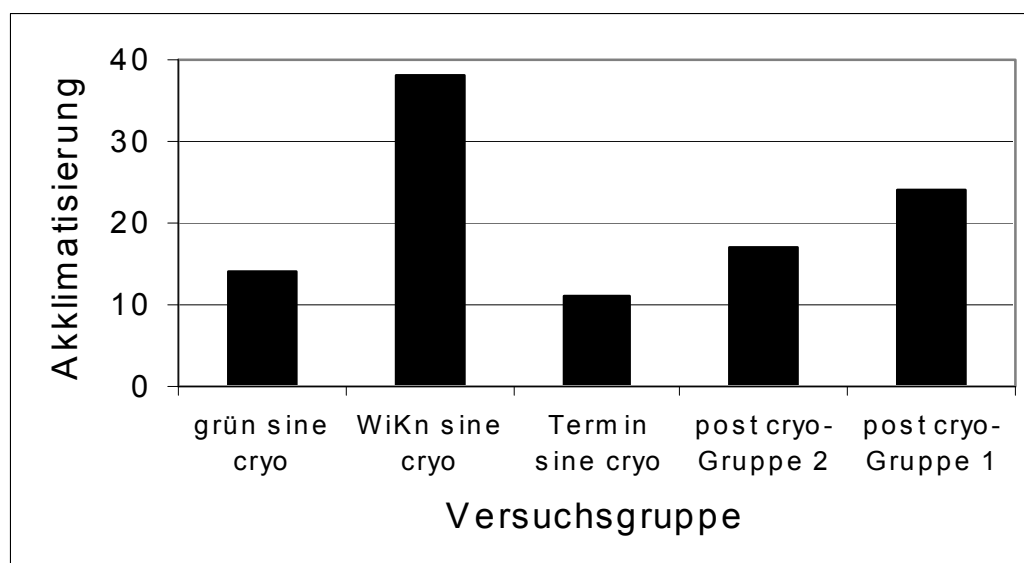


Abb. 26 Einfluss der Kryokonservierung auf die Akklimationisierung von Mikrostecklingen von *Pyrus pyraester*. Ergebnisse von 3 Versuchsgruppen ohne Kryokonservierung (sine cryo) und 2 Versuchsgruppen mit Kryokonservierung (post cryo)

Versuchsgruppen: Beschreibung siehe Anfang des Kapitels 3.4.

4. DISKUSSION

In den vorgelegten Untersuchungen wurde die Kryokonservierung von *Pyrus pyraeaster* optimiert. Die Kryokonservierung von *Sorbus torminalis* wurde erstmalig erfolgreich durchgeführt und beschrieben. Die für die Kryokonservierung notwendige in vitro Kultur wurde für beide Baumarten optimiert. Der physiologische Zustand der Ausgangspflanzen erwies sich als wichtigerer Faktor als Kulturmaßnahmen im Labor. Die Anwendung verschiedener Methoden der Kryokonservierung bei der Verwendung von in vitro Material war erst nach erheblicher Versuchsarbeit erfolgreich. Die Verwendung von Winterknospen als Ausgangsmaterial war in technischer und organisatorischer Hinsicht von großem Vorteil und für Wildbirne und Elsbeere geeignet, jedoch nicht für Vogelkirsche. Weder negative noch positive Auswirkungen der Kryokonservierung auf Wachstum und Vermehrung der Pflanzen konnten festgestellt werden. Die Zusammenhänge zwischen in vitro Kultivierbarkeit und Dormanz einerseits, sowie Kryotoleranz und Dormanz andererseits werden diskutiert.

4.1. In vitro Kultur

Bei der Optimierung der in vitro Kultur zeigte der Reisererntetermin einen überragenden Einfluss. Dies ist im Zusammenhang mit der Dormanz der als Ausgangsmaterial dienenden Winterknospen zu sehen. Dormanz ist eine temporäre, endogen regulierte und durch die Umwelt beeinflusste Unterbrechung des Wachstums (LARCHER, 1995). Die jährlich eintretende Winter-Dormanz der holzigen Pflanzen ist eine Anpassung an die widrigen Wachstumsbedingungen des Winters. Nach KRAMER and KOZLOWSKI (1979) durchlaufen die Knospen laubabwerfender Bäume verschiedene Phasen der Ruhe:

Vorruhe: correlative Hemmung

Hauptruhe: endogene Faktoren verhindern einen Austrieb

Nachruhe: exogene Faktoren (ungünstige Außenbedingungen) verhindern einen Austrieb.

Damit es in vitro zum Wachstum kommt, muss die Dormanz gebrochen werden. Dies gelingt bei Knospen, die sich im Stadium der Vorruhe befinden, bereits dadurch, dass sie vom Reis entfernt und einzeln auf Nährmedium aufgesetzt werden. Damit sind sie den hormonellen Einflüssen durch die Position am Baum, bzw. Zweig, entzogen. Im Stadium der Nachruhe wird die Dormanz dadurch gebrochen, dass in der in vitro Kultur mit 24°C bei 16-stündiger Belichtung günstige Außenbedingungen für das Wachstum geschaffen werden. Im Stadium der Hauptruhe ist es offenbar je nach Baumart verschieden, durch welche Maßnahmen die Dormanz überwunden werden kann. Für *Prunus avium* zum Beispiel ist anzunehmen, dass die den Austrieb verhindernden Faktoren vom umliegenden Gewebe ausgehen und daher das Entfernen der Knospenschuppen und Isolieren des Apex vom restlichen Gewebe in Verbindung mit den günstigen Außenbedingungen dazu führt, dass der Austrieb erfolgen kann. Die vorgelegten Ergebnisse zur in vitro Etablierung von *Prunus avium* unabhängig vom Erntetermin der Reiser unterstützen diese Annahme. Für *Pyrus pyraeaster* und *Sorbus torminalis* kann diese Annahme jedoch nicht zutreffen, da die Etablierung und anschließende Vermehrung sehr stark vom Reisererntetermin und der Reiserlagerung beeinflusst wurde.

Auf diesen Punkt wird in den publizierten Arbeiten über *Pyrus* und *Sorbus* nur wenig eingegangen. Viele Autoren bevorzugen als Ausgangsmaterial die an frischen Austrieben gebildeten „grünen Knospen“ von im Gewächshaus gezogenen Pfropflingen anstelle von Winterknospen. Der Grund liegt nicht im besseren Wachstum, sondern in den niedrigeren

Kontaminationsraten (BHOJWANI et al., 1984; LIBERALI und DAMIANO, 1997). Dies war bei den hiesigen Untersuchungen ebenfalls der Fall (5% Kontamination bei grünen Knospen, bis zu 30% bei Winterknospen). Dennoch ist die Verwendung von Winterknospen notwendig, weil bei der Arbeit mit Waldbäumen auf Grund der vielen verschiedenen Genotypen die Herstellung von Propflingen als Ausgangsmaterial für die in vitro Kultur zu aufwendig ist. Auch sind Kontaminationsraten von bis zu 30% akzeptabel, da normalerweise ausreichend Pflanzenmaterial vorhanden ist.

Bei Verwendung grüner Knospen wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls ein Einfluss des Erntetermins festgestellt. Hierzu finden sich weder für *Pyrus* noch für *Sorbus* Angaben in der Literatur. Bei anderen Pflanzenarten wurde auf den Erntetermin eingegangen. Z.B. hat RIECHERS (1993) dies für *Ericaceae* untersucht (4 Erntetermine), WALDENMAIER (1991) für *Syringa* (7 Erntetermine) und JESCH und MUSCHE (1991) für *Prunus*-Arten (5 Erntetermine). In allen drei genannten Untersuchungen wird ein Einfluss des Termins zumindest auf die Kontaminationsrate festgestellt, z.T. auch auf den Etablierungserfolg.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Etablierungsdauer durch den Erntetermin stark beeinflusst wird. In der Literatur zur in vitro Kultur von Baumarten wird dieser Zusammenhang selten untersucht. In den sehr intensiven, aber nicht auf die in vitro Kultur bezogenen Studien von GRUPPE et al. (1975) an *Prunus avium* wurden erhebliche Einflüsse auf die Austriebsbereitschaft geernteter Zweige festgestellt. Diese ist mit der in vitro Etablierungsdauer in gewisser Weise vergleichbar, hat aber nicht den Effekt des Isolierens des Apex vom umliegenden Gewebe. Bemerkenswert war hier das Fehlen jeglichen Austriebs bei Ernte am 1. Oktober. LIBERALI und DAMIANO (1997) hatten September als günstigen Etablierungstermin für Wildbirne genannt. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte ein Unterschied zwischen den Arten *Prunus* und *Pyrus* sein. Möglich ist auch der Einfluss der unterschiedlichen Klimate in Deutschland und Italien, da sowohl Induktion als auch Terminierung der Ruhephase stark von den klimatischen Faktoren beeinflusst werden.

Für *Vitis* haben CHENG et al. (1974) eine induktive Temperatur von +5°C, sowie das Kältebedürfnis sortenspezifisch ermittelt. Die Erfüllung des Kältebedürfnisses, ausgedrückt als Produkt der „relativen Temperatur“ und der „Zeit in Stunden unter +5°C“, ist jedoch in der physiologischen Wirkung von der Differenz der gegebenen Temperatur zum Schwellenwert und der Einwirkungsdauer abhängig. Dies könnte auch die Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen den Versuchsjahren bei *Pyrus pyraaster* sein. Auch bei CHENG et al. (1974) waren solche Unterschiede aufgetreten, deren Ausmaß sortenspezifisch war. Generell fanden die Autoren eine kontinuierlich ansteigende Verkürzung der Austriebsdauer ab dem ersten Frost im November bis März, die mit einer ansteigenden Austriebsrate korreliert war, was in den eigenen Untersuchungen wiederum nicht der Fall war.

Dies deutet darauf hin, dass bei *Vitis* das Kältebedürfnis erfüllt war, während es für *Pyrus pyraaster* nicht erfüllt war. SAURE (1985) nennt als Kältebedürfnis für *Pyrus* bis zu acht Wochen bei 2° bis 7°C, während er für *Prunus* bis zu 10 Wochen angibt. Auf der anderen Seite haben die hier untersuchten *Prunus*-Knospen keine gravierende Austriebshemmung oder -verlängerung in Abhängigkeit vom Erntetermin gezeigt. Dies stimmt mit den langjährigen Erfahrungen von MEIER-DINKEL (persönliche Mitteilung) überein. Es ist zu vermuten, dass die in der in vitro Kultur applizierten Hormone das Verhalten je nach Baumart unterschiedlich beeinflussen und *Prunus avium* besonders leicht manipulierbar ist. Bei *Pyrus pyraaster* könnten die Reaktionen im ersten Versuchswinter 99/00 (Serie 1) darauf schließen lassen, dass im Dezember und Januar die Hauptruhe vorliegt, deren Kältebedürfnis durch

Reiserlagerung nicht erfüllt wird und die nicht durch die in der in vitro Kultur applizierten Hormone beeinflussbar ist. Ab Februar kann das Kältebedürfnis durch Lagerung erfüllt werden und ab März sind die Knospen dem Einfluss der Hormone der in vitro Kultur besonders gut zugänglich. Somit müssen sich die Wildbirnen im Februar bereits im Stadium der Nachruhe befunden haben.

Das gänzlich andere Verhaltensmuster im zweiten Versuchswinter 2000/2001 könnte mit dem Witterungsverlauf zusammen hängen. Die Daten der meteorologischen Station der NFV-C in Escherode (Abbildungen 27 a und b), die vom Wildbirnen-Standort ca. 50 km entfernt liegt, belegen folgendes: Unter der Annahme, dass für *Pyrus* 5°C die kritische Temperatur ist, bleiben in 1999/2000 die Maximalwerte ab Ende November bis Mitte Februar kontinuierlich darunter (einen Ausreißer gibt es Anfang Dezember). Die Minimalwerte bleiben ab Ende Oktober bis Ende März unter 5°C. Dagegen wechselten in 2000/2001 die Maximaltemperaturen mehrmals über und unter die 5°C-Marke. Sie war unterschritten zu Ende Dezember, Anfang Januar, Ende Januar, Anfang März und Mitte März. Dazwischen wurde sie z.T. ganz erheblich (8°C im Februar, 10°C im Dezember) mehrmals überschritten. Die Minimaltemperaturen blieben ab Mitte November konstant unter 5°C, mit einer Ausnahme Mitte Dezember. Wenn tatsächlich der Abstand zur „kritischen Temperatur“ die Induktion oder Aufhebung der Knospenruhe bewirkt, dann befanden sich die Wildbirnen in 2000/2001 in einem ständigen Wechsel zwischen Ruhe und Aktivität. Die Etablierungsergebnisse passen zu dieser Annahme.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass es auch noch andere Faktoren gibt, die die Induktion, Intensität und Dauer der Dormanz beeinflussen. Hierzu zählen nach KRAMER und KOZLOWSKI (1979) die Mineralverfügbarkeit und die Wasserversorgung. POWELL (1970) berichtete, dass die Dormanz der Knospen vom apikalen zum basalen Teil des Zweiges zunahm, also ein Topophysis-Effekt vorliegt. Andererseits zeigt bei *Malus domestica* immer die terminale Knospe tiefere Dormanz als die axillären Knospen (BAILLY and MAUGET, 1989). Weder der Mineralverfügbarkeit, noch der Wasserversorgung noch den Topophysis-Effekten konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nachgegangen werden. Letztere wurden insofern beachtet, als versucht wurde, bei jedem Erntetermin gleichmäßig Reiser aus dem oberen und mittleren Kronenbereich zu schneiden und beim Zerkleinern der Reiser die apikalen und basalen Stücke gut gemischt auf die unterschiedlichen Varianten zu verteilen. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass diese Zufallsverteilung manchmal nicht ganz gleichmäßig war.

Elsbeere reagierte positiv sowohl mit höheren Etablierungsraten als auch kürzerer Etablierungsdauer auf die Reiserlagerung. Daher fiel besonders auf, dass im Februar weder mit noch ohne Lagerung in vitro Kultur möglich war. Es könnte sein, dass die Hauptruhe erst sehr spät eintritt. Eine weit verbreitete Ansicht ist, dass die Hauptruhe in Dezember/Januar vorliegt und durch exogene Maßnahmen schwer oder gar nicht aufzuheben ist. Aber es ist nicht auszuschließen, dass sie bei *Sorbus torminalis* erst im Februar erreicht ist und daher 8 Wochen Lagerung bei 5°C zur Stillung des Kältebedürfnisses nicht ausreichen.

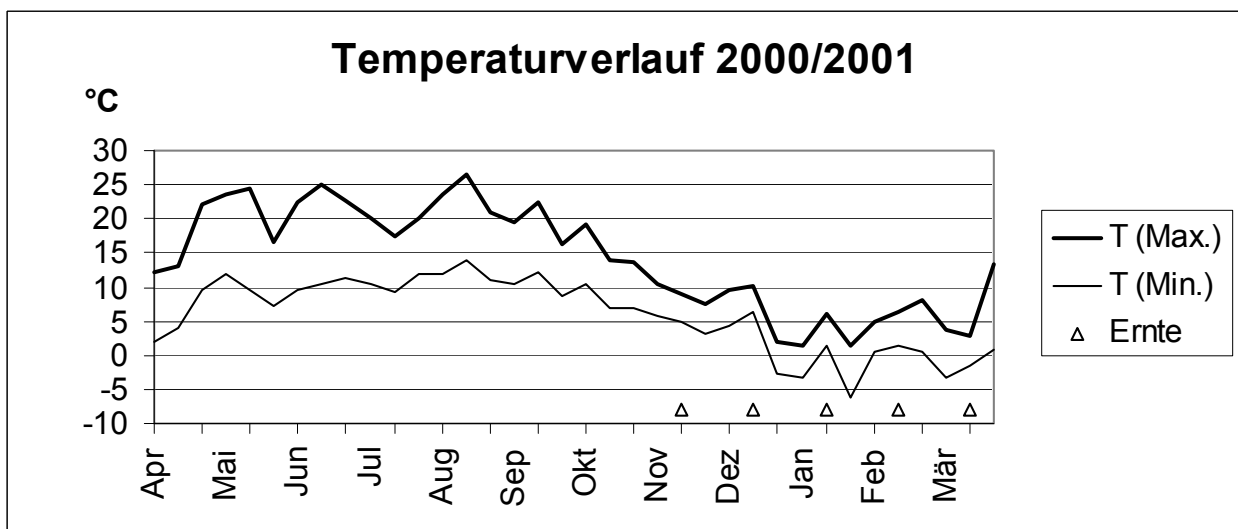
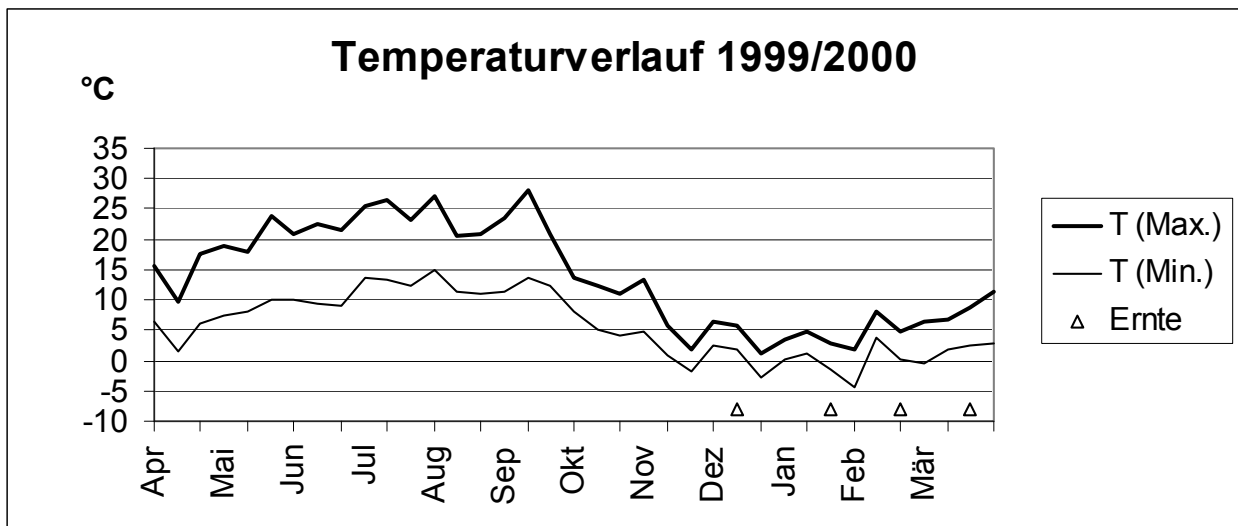


Abb. 27 a und b Temperaturdaten der meteorologischen Station der NFV-C in Escherode

T (Max.) = Maximale gemessene Temperaturen in Dekadenwerten

T (Min.) = Minimale gemessene Temperaturen in Dekadenwerten

Dekadenwert = Mittelwert von 10 Tagen

Ernte = Reisererntetermin

Für *Malus domestica* stellten SKIRVIN et al. (1986) fest, dass Ausgangsmaterial, das direkt vom Feld geerntet wurde, nur selten zu „guten“ Sprosskulturen führte mit Ausnahme von Ernten im frühen Frühling. Dies scheinen die eigenen Untersuchungen insofern zu bestätigen, als die Kulturen von *Pyrus pyrastra* und *Sorbus torminalis* mit den höchsten Etablierungsraten bei Erntetermin März, also frühem Frühling, erzielt wurden. Aber die kürzeste Etablierungsdauer und die höchsten Vermehrungskoeffizienten kamen bei anderen Ernteterminen zustande. Daher bedarf es zunächst der Definition einer „guten Sprosskultur“ bevor Vergleiche möglich sind. Diese Definition geben SKIRVIN et al. (1986) nicht.

Bewertungen in allgemeiner Form („gut“), die nicht definiert werden, wie z. B. in der Veröffentlichung von SKIRVIN et al. (1986), erschweren das Vergleichen und Diskutieren.

Die eigenen Ergebnisse machen es der Autorin schwer zu sagen, welche Variante „gut“ ist. Wenn unter „gut“ die höchste Etablierungsrate, kürzeste Etablierungsdauer und höchsten Vermehrungskoeffizienten zu verstehen sind, gibt es keine eindeutige Antwort, da diese drei Eigenschaften in keiner der untersuchten Varianten zusammen auftraten. Wenn als „gut“ die Variante verstanden wird, bei der – im Vergleich zu den anderen vorhandenen Varianten - mit dem geringsten Arbeitsaufwand in kürzester Zeit eine bestimmte Pflanzenstückzahl produzierbar ist, ist eine eindeutige Antwort möglich. Hilfreich ist dabei die Abbildung 10 „Einfluss von Reisererntetermin und Reiserlagerung auf den Verlauf von Etablierung, Etablierungsdauer und Vermehrung bei Winterknospen von *Pyrus pyrausta* in Kap. 3.1.4.4., aus der das Zusammenwirken der drei Komponenten zu erkennen ist. Im Text zur Abbildung wurde an einem Beispiel bereits erläutert, welche der Varianten bei der og. Definition von „gut“ als die beste anzusehen ist. In der Praxis kann sich dies durch äußere Umstände wieder verschieben, wenn z.B. zu dem gewünschten Reisererntetermin nicht die notwendigen Arbeitskräfte zur Verfügung stehen oder keine Kühlkammer für die Reiserlagerung vorhanden ist. In diesem Fall ermöglichen es Untersuchungen wie diese hier, die Konsequenzen einzuschätzen und die Variante zu wählen, die unter den gegebenen Umständen zum bestmöglichen Ergebnis führt.

Es waren insbesondere die Versuche zum Einfluss von Jacquot-Vitaminen im Etablierungsmedium von Elsbeere und der Vergleich der 3 Vermehrungsmedien für Wildbirne, die gezeigt haben, dass heutzutage die Grundlagen für die in vitro Kultur so gut gelegt sind, dass durch Medienversuche nur noch geringfügige oder keine Verbesserungen eintreten. Man könnte dies mit der Entwicklung der Einheitserde im Gartenbau vergleichen, die heute mit nur geringfügigen Anpassungen für eine Vielzahl von Pflanzenarten einsetzbar ist und die früher übliche Herstellung von Spezialsubstraten weitestgehend überflüssig macht. Auf dem Gebiet der In vitro Kultur liegt seit den grundlegenden Arbeiten von MURASHIGE und SKOOG (1962) ein Basismedium vor, dass wie die Einheitserde für die große Mehrzahl der Pflanzenarten geeignet ist. Durch die Vielzahl der seither publizierten Vermehrungsprotokolle sind die Rahmenwerte für Konzentration und Kombination weiterer Medienbestandteile, wie z.B. Wachstumsregulatoren, bekannt. Verbesserungen von Produktionsleistungen im 1-stelligen Prozentbereich oder darunter sind für kommerzielle Betriebe von Belang, aber bei Anwendungen in Genbanken, im Züchtungsbereich und in der Forschung (sofern dieses nicht gerade das Schwerpunktthema ist) spielen sie keine Rolle. Hier ist die Zuverlässigkeit einer Methode bei der Anwendung auf eine Vielzahl von Genotypen mit großer genetischer Bandbreite das wichtigere Kriterium. Dieser Forderung wurde in der vorliegenden Arbeit so weit wie möglich Rechnung getragen.

Bei den Anwendungsbereichen Genbank und Züchtung kommt erschwerend hinzu, dass i.d.R. die Vermehrung von adulten, manchmal schon seneszenten, Bäumen erforderlich ist. Die für die Züchtungsselektion relevanten Merkmale, wie z.B. die Stammform, sind erst in der adulten Phase der Bäume erkennbar. Die Sicherung einzelner Genotypen bedrohter Arten wie z.B. *Pyrus pyrausta* muss sofort erfolgen, wenn ein Individuum gefunden wird – unabhängig von dessen Alter. Die Pfropfung ist eine mögliche Maßnahme, aber sie sollte durch die in vitro Kultur abgesichert werden. Dies ist besonders dann wichtig, wenn der betreffende Baum zufällig auch noch ein Plusbaum ist, dessen vegetative Vermehrung für Samenplantagen und eventuell auch Wertholzplantagen wünschenswert ist. An den Etablierungsraten in der vorliegenden Arbeit ist zu erkennen, welche Schwierigkeiten hieraus resultieren. Bei Wildbirne gelang im ersten Versuch (vgl. Kap. 3.1.1.1.1.) die Etablierung nur bei 3 von 12 Klonen. Bei Elsbeere waren es 8 von 20 Klonen (vgl. Kap. 3.1.1.2.). Im Vergleich dieser Etablierungen mit bereits im Labor vorhandenen Klonen wurde aufgezeigt, wie sich ein höheres Alter der Spenderbäume erschwerend auswirkt (vgl. Kap. 3.1.2.4.). Dies wird

mehrmals in der Literatur bestätigt, wie aus der Zusammenfassung von PIERIK (1987) hervorgeht. An *Betula* spp. (1991) und *Prunus avium* (1986) konnte MEIER-DINKEL die Möglichkeit der Rejuvenilisierung durch die in vitro Kultur nachweisen, was im Hinblick auf die Nutzung der in vitro Technik für Genbankzwecke ebenso wie für Wertholzplantagen von Vorteil wäre.

Nach dem Einfluss der Dormanz (Erntetermin, Reiserlagerung) war in den vorliegenden Untersuchungen die Art des Kulturgefäßes ein wichtiger Faktor in der Beeinflussung der Vermehrung. Dies ist ein Bereich der Kulturtechnik, dem in den Publikationen nicht immer die nötige Aufmerksamkeit gewidmet wird, obwohl dieser Einfluss so groß sein kann, dass er bei sensiblen Klonen darüber entscheidet, ob die Pflanzen leben oder sterben. (vgl. Kap. 3.1.2.2. Klon B 414). Dies dürfte, neben anderen, einer der Gründe für die Schwierigkeiten bei der Übertragung von Methoden von Labor zu Labor sein.

Dennoch ist es nicht möglich festzulegen, welches Gefäß das Beste ist, denn die in vitro Kultur muss in ihrer Gesamtheit gesehen werden und die einzelnen Komponenten müssen zueinander passen. Im Labor der NFV-C werden Weckgläser mit Filzring-Einlage wegen ihres guten Gasaustauschs favorisiert. In dem hier vorgestellten Versuch „Vergleich zwischen Weckgläsern und Honiggläsern“ (vgl. Kap. 3.1.2.2.) war die Kondenswasserbildung in Honiggläsern aufgefallen, die bei Weckgläsern fehlte – ein Hinweis auf die bessere Belüftung in Weckgläsern, die gleichzeitig auch mehr Wasserdampfdiffusion ermöglicht. Die gleiche Eigenschaft kann jedoch in Kulturräumen mit stärkerer Luftbewegung zu einer schnellen Austrocknung der Medien und damit zum Absterben der Kulturen führen.

SHORT et al. (1987) haben die relative Luftfeuchtigkeit (rLF) in Kulturgefäßen mit verschiedenen Verschlüssen gemessen. Sie fanden bei fest verschlossenen Schraubdeckeln 100% und bei lose gelassenen Schraubdeckeln 80% rLF. Einzelne Kulturen haben unterschiedliche rLF-Optima. Wenn diese überschritten werden, besteht die Gefahr der Hyperhydrizität, bei Unterschreiten Wuchsdepression bis Absterben. 75 bis 80% rLF gelten als untere Grenze (GEORGE, 1993). LANE (1982) berichtet von Sprossnekrosen bei rLF unter 95% bei Birnen. In der vorliegenden Arbeit wurden weder Sprossnekrosen in Weckgläsern mit möglicherweise niedrigerer rLF noch Hyperhydrizität in Honiggläsern mit offensichtlich hoher rLF beobachtet. Letztere ist dennoch nicht auszuschließen, da sie oft von außen schwer erkennbar ist.

Von den Faktoren, die die Gaszusammensetzung im Kulturgefäß beeinflussen, stimmten bei Weck- und Honiggläsern Gesamtvolumen und das Luftvolumen über dem Medium nahezu überein, während die Art des Verschlusses und die Medienmenge (Weckgläser: 80 ml; Honiggläser: 50 ml) unterschiedlich waren. Hier hätte die geringere Medien- und damit Nährstoffmenge in den Honiggläsern dazu führen können, dass sie das Pflanzenwachstum begrenzt. Im Hinblick auf die Sprossanzahl und -größe war das jedoch nicht der Fall.

Es ist möglich, dass das Trockengewicht der Pflanzen aus Honiggläsern erniedrigt war. Das würde die schlechteren Akklimatisierungsergebnisse bei den 3 der 4 getesteten Klone erklären (vgl. Tab. 17, Kap. 3.1.3.1.). Der durch den Schraubdeckel behinderte Gasaustausch in den Honiggläsern im Vergleich zu Weckgläsern bewirkt das Absenken von CO₂ und die Anreicherung von O₂ während des Tages. CO₂-Mangel begrenzt das Wachstum von photosynthetisch aktiven Pflanzen. Da die Pflanzen in den Honiggläsern kräftig wuchsen, litten sie offenbar nicht unter CO₂-Mangel. Möglich ist, dass sie einen mixotrophen Stoffwechsel hatten, indem sie die Saccharose aus dem Medium als Kohlenstoffquelle nutzten. Dafür spricht auch die Beobachtung, dass die Blattfläche gegenüber den Pflanzen in

Weckgläsern stark verkleinert war, was eine geringere Photosyntheseleistung zur Folge haben musste. Auch das könnte zur schlechteren Akklimatisierung nach dem Pikieren beigetragen haben. Eine mögliche Erklärung lautet daher: Im Vergleich zur Kultur in Weckgläsern photosynthetisieren Pflanzen in Honiggläsern weniger, sind weniger autotroph, haben dadurch größere Schwierigkeiten bei der Umstellung auf Erde und sind gleichzeitig anfälliger für Pilzbefall, weil sie ein geringeres Trockengewicht haben - „weicher“ sind.

Bei *Sorbus torminalis* wurde der Einfluss des Explantattyps (Segmentierung) auf die Vermehrung untersucht (vgl. Kap. 3.1.2.3.). Mononodiale Sprosssegmente führten zu besseren Vermehrungskoeffizienten als Einzelsprosse, ohne dass Nachteile beobachtet wurden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von WALDENMAIER (1991). Er berichtet, dass mit Hilfe der Axillarsprossmethode, wie er die Teilung der aus Axillarsprossen entstandenen Sprossbüschel nennt, bis zu doppelt so hohe Vermehrungsraten erzielt wurden wie mit der Einzelsprossmethode, die der Segmentierung entspricht. Allerdings bezieht er seine Zahlen aus lediglich drei Subkulturen. Die Autorin hält das nicht für ausreichend, da gerade bei der Segmentierung starke Schwankungen von Transfer zu Transfer auftreten. PIERIK (1987) behauptet, dass dafür wenige oder keine Cytokinine gebraucht werden, was auch nicht den Erfahrungen der Autorin entspricht. Bei Elsbeere waren es gerade die mononodialen Segmente, die für ein gutes Wachstum ein Medium mit höherem Cytokinin-Gehalt benötigten (Medium 87/27 mit 0,5 mg/l BAP) als Einzelsprosse (Medium 2/5 mit 0,3 mg/l BAP).

Wie die exemplarischen Bewurzelungs- und Abhärtungsversuche mit dem Wildbirnen-Klon 320-8 (vgl. Kap. 3.1.3.3.) zeigten, sind die Optimierungsmöglichkeiten dieser Phase der in vitro Kultur nicht ausgeschöpft. Man sollte den physikalischen Bedingungen während der Abhärtung viel mehr Aufmerksamkeit schenken als z.B. den Varianten in der Hormonzusammensetzung der Nährmedien. Dafür spricht auch ein Vergleich der Akklimatisierungserfolge in Abhängigkeit vom Pikiertermin sämtlicher in der NFV-C pikierten Wildbirnen in den Jahren 1999 und 2000 (Daten nicht gezeigt):

In beiden Jahren wurden zwischen März und September jeweils ca. 2200 Mikrostecklinge pikiert. In 1999 wurde eine Gesamt-Akklimatisierung von 29% und in 2000 von 33% erzielt. Die Schwankungen innerhalb eines Jahres betrugen bis zu 50%. Ab der zweiten Hälfte des Sommers, ungefähr ab Mitte Juli, waren in beiden Jahren die Akklimatisierungserfolge höher als in der ersten Hälfte des Sommers und sanken zum September hin wieder ab, mit einem Peak zwischen Ende Juli und Anfang August.

Dieser Verlauf lässt sich den jeweils vorherrschenden Temperaturbedingungen und / oder Sonnenschein zuordnen. Während des Juli 1999 betrugen die erfolgreichen Akklimatisierungen ca. 45%. Es herrschte eine Durchschnittstemperatur von 18° bis 20°C. Im selben Zeitraum des Jahres 2000 lagen die Akklimatisierungserfolge zwischen 8% und 25%. Die Durchschnittstemperaturen betrugen 13° – 15°C.

Im Juni waren die Temperaturen der beiden Jahre annähernd gleich (+/- 17°C), aber die Lichtmenge im darauf folgenden Monat war sehr unterschiedlich. Der Juli des Jahres 2000 war ein ausgesprochen dunkler Monat. Die Strahlungsmenge lag ab dem 24.6.00 fast immer unter 2,5 KWh/d/qm. Der Juli-Durchschnitt betrug 1,6, während er im Vorjahr 3,4 betragen hatte. Am Beispiel des Klons 320-8, der, vom gleichen Bewurzelungsmedium kommend, sowohl Anfang Mai als auch Ende Juni 2000 pikiert wurde, ist zu sehen, dass nicht nur hohe Temperaturen, sondern auch hohe Lichtmengen für einen guten Abhärtungserfolg notwendig sind – mehr noch: Der Pikiertermin beeinflusste das Abhärtungsergebnis in weit stärkerem

Maße als Nährmedium oder Genotyp. Aus den vorliegenden Daten lassen sich keine Schwellenwerte und daher auch keine konkreten Empfehlungen ableiten. Aber es wäre im Hinblick auf eine kommerzielle Nutzung, die nur bei hohen Akklimatisierungserfolgen wirtschaftlich ist, interessant, diese zu erarbeiten. Bei den Publikationen fehlen sie in aller Regel.

In Lehrbüchern wird zum Thema „Abhärtung“ nur auf wenige Faktoren eingegangen, vor allem auf die Luftfeuchtigkeit und die Substrate. Zu Temperatur und Belichtung steht entweder nichts oder nur im Nebensatz „spielt auch eine Rolle“ (GEORGE, 1993, KYTE and KLEYN, 1999; PIERIK, 1987). KYTE und KLEYN (1999) regen an, den Akklimatisierungsraum bezüglich Licht und Temperatur genauso regelbar auszustatten wie den Kulturraum. Dennoch gibt es in den zahlreichen Rezepten ihres Buches zwar exakte Angaben zu Licht und Temperaturen der einzelnen Pflanzenarten während der in vitro Kultur, aber keine über die ex vitro Phase. CHALUPA (1987, S. 227) führt wenigstens die Temperatur an, die für eine ex vitro Bewurzelung geeignet ist. Angaben über eine geeignete Lichtstärke fehlen. Für die Akklimatisierung nach der in vitro Bewurzelung nennt er weder Temperatur noch Lichtstärke. Es ist offenbar so, dass bis in die 90er Jahre hinein dieser Aspekt vernachlässigt wurde. DRIVER and SUTTLE (1987) widmen zwar dem Thema „Abhärtung und Anzucht“ ein ganzes Kapitel, aber konkrete Angaben fehlen. Als Temperaturen für optimales Wachstum nennen sie 15°C Minimum basale Wärme und maximale Lufttemperatur 38°C. Dazu empfehlen sie „adäquate“ Tageslänge und Lichtintensität. Genauere Angaben fehlen.

Als Indiz für eine recht späte Bearbeitung dieses Themas dient der Vergleich zwischen der Posterschau auf dem IAPTC-Kongress 1990 in Amsterdam und dem Symposium über Qualitätssicherung 1999 in Cork, Irland: In Amsterdam waren 241 Poster dem Thema „Vegetative Vermehrung“ gewidmet, davon 12 zu Bewurzelung und Abhärtung. Als eigenes Thema gab es Bewurzelung und Akklimatisierung nicht. Von den Autoren dieser 12 Poster machte keiner Angaben zu Licht und Temperatur. In Cork stand ein ganzes Symposium (von 7) unter der Überschrift „Vorbereitung der Mikropflanzen für die Abhärtung“ mit 12 ausführlichen Beiträgen. Von diesen waren 5 mit Angaben über Licht und Temperatur während der Versuchsphase versehen. Dies zeigt, dass der Akklimatisierungsphase heute mehr Aufmerksamkeit entgegengebracht wird und es ins Bewusstsein gedrungen ist, dass Hormone oder relative Luftfeuchtigkeit nur 2 Faktoren unter vielen sind.

DEBERGH et al. (2000) berichten über publizierte Studien zur Hyperhydrität: Sie ist mit bloßem Auge oft nicht sichtbar und behindert Bewurzelung und Abhärtung (siehe eigene Ergebnisse / Kommentar zu Honiggläsern oben). Die Autoren geben an, dass mikrovermehrte Pflanzen in den ersten Tagen nach dem Pikieren sehr Licht-sensibel sind: Photohemmung und Photostörung können schon bei Lichtintensitäten auftreten, die von „normalen“ Pflanzen gut vertragen werden. Die eigenen Ergebnisse zeigten ein besonders schlechtes Anwachsen in Zeiten mit niedrigen Lichtintensitäten (s.o.), aber das ist möglicherweise von der Pflanzenart abhängig und / oder eine Funktion von Temperatur und Licht. Ein in diesem Zusammenhang auch selten untersuchter Aspekt sind die Ergebnisse von MOREIRA DA SILVA et al. (1997) zur Lichtqualität: In Abhängigkeit vom Verhältnis kurzwelligen Lichts zu langwelligen Lichts stieg die Akklimatisierung von *Azorina vidalii* von 19% auf bis zu 91% an.

Obwohl MAENE bereits 1985 nachgewiesen hat, dass ein in vitro entwickeltes Wurzelsystem unter ex vitro Bedingungen nicht immer seine Funktionen erfüllen kann, wird den Bewurzelungserfolgen in vitro immer noch eine große Bedeutung beigemessen. Da dies so

üblich ist, wurden in der vorliegenden Arbeit einige Daten zur in vitro Bewurzelung angegeben. Aber beim Vergleich der Prozentzahlen von Bewurzelung und Akklimatisierung fiel der Autorin immer wieder auf, dass die Anzahl akklimatisierter Pflanzen höher war als die Anzahl bewurzelter Pflanzen. Es findet also teilweise in beträchtlichem Umfang ex vitro Bewurzelung statt, obwohl gezielte Versuche hierzu (Daten nicht gezeigt) völlig fehlschlagen. Man könnte daher annehmen, dass die sogenannte Bewurzelungsphase auf dem sogenannten Bewurzelungsmedium möglicherweise nur eine Wurzelinduktionsphase ist, die die anschließende ex vitro Bewurzelung begünstigt.

Die Verwendung von Graphit im Medium hatte sich sowohl bei *Pyrus pyraeaster* als auch bei *Sorbus torminalis* negativ auf die Akklimatisierung ausgewirkt. Dies entsprach nicht den Erwartungen, denn 1. soll Graphit chemisch inert und somit im schlechtesten Fall ohne Einfluss sein, und 2. wird allgemein angenommen, dass durch die Dunkelfärbung des Mediums und die Reduzierung des Lichteinfalls im basalen Teil des Mikrostecklings in der Dunkelheit ablaufende Prozesse wie z. B. die Wurzelbildung gefördert werden (GEORGE, 1993). Auf der anderen Seite hat NÉMETH (1979) bei *Prunus* mit 2000 lx Belichtung höhere Bewurzelungswerte erhalten als mit 800 lx Lichtintensität und SRISKANDARAJAH et al. (1982) erzielten hohe Bewurzelungswerte bei Apfel unter Dauerlicht. Blattscheiben von *Prunus mahaleb* bewurzelten nur im Licht (HEDTRICH, 1977). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Wurzelinduktion ein Prozess ist, der nicht notwendigerweise im Dunkeln abläuft. Möglicherweise war das bei dem hier geprüften Material auch der Fall.

4.2. Kryokonservierung

Es gehörte zur Aufgabenstellung, Kryokonservierungsmethoden zu evaluieren, die auf das vorliegende Material unter den gegebenen Umständen und im Hinblick auf den Aufbau einer Kryo-Genbank für Konservierungs- und Züchtungszwecke anwendbar sind. Dabei konnte für *Pyrus pyraeaster* auf verschiedene bereits publizierte Methoden zurückgegriffen werden, während für *Sorbus torminalis* erstmalig Kryokonservierungsversuche durchgeführt wurden. Die unter dieser Fragestellung durchgeführten Versuche ergaben, dass sowohl in vitro Material als auch Winterknospen als einzufrierendes Material in Frage kommen und je nach Rahmenbedingungen dem einen oder dem anderen der Vorzug zu geben ist.

Es zeigte sich, dass bei Verwendung von in vitro Material von *Pyrus pyraeaster* eine bisher in der Literatur nicht beschriebene Kombination von Vitrifizierung und Droplet-Technik anwendbar ist, die die Vorzüge einer relativ kurzen Vorbehandlung mit geringem technischen und Arbeits-Aufwand verbindet. Es wurde bei der Entwicklung der Methode sehr auf die Praktikabilität geachtet, um die spätere Anwendbarkeit in der Praxis zu gewährleisten. Das computergesteuerte langsame Einfrieren, wie es von mehreren Autoren beschrieben wurde (SUZUKI et al., 1987; REED, 1990; DEREUDDRE et al., 1990; REED et al., 1998; CHANG and REED, 2001), wurde für diese Arbeit nicht in Erwägung gezogen. Diese Geräte sind teuer, die Einarbeitungszeit bis zur zuverlässigen Benutzung ist lang, und die Ergebnisse sind nur mit Schwierigkeiten reproduzierbar (JÖRGENSEN, persönl. Mitteilung).

Eine Methode, die von der Geräte-Ausstattung her nicht aufwendig ist, ist die Methode der Einkapselung in Alginatkugeln. Es wurde die für *Pyrus pyraeaster* beschriebene Methode des Einkapselns in Alginatkugeln und der anschließenden Trocknung (DEREUDDRE et al., 1990) nachvollzogen. Dabei stellte sich heraus, dass das hier verwendete Material von *Pyrus pyraeaster* den ersten Schritt, die Kältebehandlung zwecks Abhärtung, nicht gut vertrug, das

Wachstum durch Einkapseln weiter verschlechtert wurde und nach dem Trocknen viele Apices abgestorben waren. Damit war das Nacharbeiten der Original-Methode schon vor der Kryokonservierung nicht gelungen, und es wäre notwendig gewesen, die einzelnen Schritte anzupassen. Dies ist nicht durchgeführt worden, weil sich gezeigt hatte, dass die Methode im Ganzen sehr umständlich und störanfällig ist. So ist es z.B. sowohl für das Trocknen als auch für das Gefrieren äußerst wichtig, dass Apices und Alginat-Kugeln immer die gleiche Größe haben, denn nur dann ist die Geschwindigkeit des Trocknens und Gefrierens gleich (siehe auch Kapitel 3.2.1.1.1. Trocknungsmethoden), was für die Reproduzierbarkeit von großer Bedeutung ist. Es erfordert einige Übung, bis die in Handarbeit hergestellten Alginat-Kugeln uniform gelingen. Noch schwieriger ist es, sie so herzustellen, dass ihre Größe und Form unabhängig von der ausführenden Person ist. Dies ist ein schwerwiegender Nachteil der Methode. Daher wurde sie auch bei Elsbeeren nicht weiter verfolgt, obwohl diese weniger empfindlich auf die Einkapselungsprozeduren reagierten als Wildbirnen.

Die in dieser Arbeit für *Pyrus pyraaster* entwickelte Vitrifizierungs-Droplet-Methode ist vielversprechend, weil sie bei 3 Klonen und in mehreren Varianten erfolgreich war. Sie ist technisch nicht zu schwierig und vom Zeitaufwand her vertretbar, daher weitaus „benutzerfreundlicher“ als die publizierten Methoden. Es ist jedoch notwendig, sie in jeder Hinsicht auf eine breitere Basis zu stellen. Sowohl Dauer als auch Konzentrationen der Vorbehandlungen benötigen noch eine Feinabstimmung. Die Anwendung auf eine größere Anzahl Klone ist noch zu prüfen.

Für die Kryokonservierung von in vitro Material von Elsbeere sind mit dieser Arbeit Grundlagen gelegt. Sie lassen erwarten, dass Kryokonservierung möglich ist. Möglicherweise ist die Vitrifizierungs-Droplet-Methode in gleicher Weise anwendbar wie für Wildbirne. Erste Versuche nach demselben Versuchsplan wie für Wildbirne (Tabelle 32) zeigten, dass Elsbeeren in mehreren der geprüften Varianten ohne Kryokonservierung Wachstum zeigten (Abbildung 42 im Anhang; Daten nicht gezeigt).

Die Kryokonservierung von Winterknospen gelang bei *Pyrus pyraaster* und *Sorbus torminalis*. Es zeigte sich eine Abhängigkeit vom Erntetermin. Die Anwendung des TTC-Tests als Schnelltest für die Ermittlung der Vitalität nach dem Gefrieren ließ keine Rückschlüsse auf das Vermögen zur Sprossregeneration zu. Die Anwendung der für Wildbirne und Elsbeere ermittelten Kryokonservierungsmethode war bei *Prunus avium* nicht erfolgreich.

Die in den Vorversuchen ermittelten und mit dem TTC-Test evaluierten Einflüsse der Gefriereschwindigkeit und Auftaugeschwindigkeit hatten die besten Ergebnisse bei schrittweisem Vorgefrieren bis -30°C und langsamem Auftauen ergeben. Dies entsprach vollkommen den Erwartungen. WINKLER (1913) hatte bereits an Zweigen verschiedener Bäume festgestellt, dass die Temperatur, bei der das Gewebe abstirbt, bei langsamem Gefrieren sehr viel niedriger liegt (er gibt „unter -30°C “ an) als bei schnellem Gefrieren (-22°C). Umgekehrt ist bei gegebener Gefriertemperatur der Schaden nach langsamem Gefrieren geringer als nach schnellem Gefrieren (HILDRETH, 1926). Auch der Einfluss der Auftaugeschwindigkeit auf das Ausmaß der Schädigung ist schon früh beschrieben worden (HOFFMANN, 1857). Diese Beobachtungen sind seither an einer Vielzahl von Bäumen bestätigt worden. In neuerer Zeit wurden u.a. die Gattungen *Morus*, *Populus*, *Salix*, *Pyrus*, *Malus*, *Betula* untersucht (SAKAI, 1960; SAKAI and NISHIYAMA, 1978; TYLER and STUSHNOFF, 1988; NIINO et al., 1995).

Die Anwendung der Methode auf eine größere Anzahl Genotypen hatte sich bei Prüfung mit dem TTC-Test als geeignet erwiesen, dennoch war die Regeneration von Pflanzen in vitro nur

in wenigen Fällen erfolgt. Diese Diskrepanz war unerwartet hoch, da der TTC-Test trotz aller Einschränkungen, denen jede Testmethode unterliegt, vielfach angewendet wird (ENGELMANN, persönl. Mitteilung; BENSON, 1999). In einem Vergleich von 5 Methoden zur Ermittlung der Vitalität wurden der mikroskopische TTC-Test und die Messung der Elektrolyt-Verluste als geeignet für das Screening bei der Entwicklung neuer Methoden befunden (VERLEYSEN et al., 2004).

Die Ursachen für die beobachteten Diskrepanzen könnten darin liegen, dass die Zellen zwar nicht tot waren und daher das TTC reduzieren konnten, aber doch geschädigt waren, so dass sie nicht regenerieren konnten. Die das TTC reduzierenden Dehydrogenasen sind im Cytoplasma lokalisiert. Es ist bekannt, dass diese Enzyme auch in teil-geschädigten Zellen noch längere Zeit aktiv bleiben können. Daher empfehlen LARCHER und EGGARTER (1960) einen Zeitraum von mindestens 24 Stunden zwischen Auftauen und Vitalitätsbestimmung. Dies wurde hier eingehalten. Eine falsche Beurteilung als Fehlerquelle kann bei der hier angewandten topographischen Beurteilung weitgehend ausgeschlossen werden, da sich die gefärbten Bereiche sehr eindeutig von den ungefärbten abhoben. Die im Vorversuch ermittelten Werte hatten in deutlichem Bezug zur Behandlung gestanden und waren auch wiederholbar gewesen (Ergebnisse von 3 Materialgruppen). Es hatte keinen Anlass gegeben, an der Aussagekraft des Tests zu zweifeln. Daher kann nur vermutet werden, dass entweder die Reduktasen geschädigter Zellen länger als von LARCHER und EGGARTER angegeben aktiv sind oder dass das Fehlen der Regeneration auf andere Ursachen als Gefrierschäden zurückzuführen ist.

Bei der Arbeit mit Winterknospen liegt die Vermutung nahe, dass die Dormanz der Knospen den Austrieb hemmt.

Einen Hinweis darauf geben die T12-Werte, die bei *Sorbus torminalis* erhoben wurden. Es ist sicher zulässig anzunehmen, dass Pflanzengewebe, welches 12 Wochen lang grüne Farbe als Zeichen von Vitalität zeigt, im Wesentlichen intakt ist. Bei solchen Apices könnte das Wachstum auf Grund anderer Ursachen als Gefrierschäden ausbleiben. Ein ähnliches Verhalten ist auch bei *Sorbus torminalis* ohne Kryokonservierung beobachtet worden, ohne dass die Ursachen geklärt werden konnten. Mögliche Faktoren könnten sein: die Zusammensetzung des Mediums (höhere oder niedrigere Hormonkonzentrationen, andere Hormone, andere Zucker, andere Salze erforderlich), Licht- und / oder Temperatureinflüsse oder Topophysis-Effekte. Letztere könnten dafür verantwortlich sein, dass manchmal extrem wuchs- und vermehrungsfreudige Knospen auftreten, die eine Optimierung der Methode nicht mehr notwendig erscheinen lassen. In dieser Arbeit wurde einigen möglichen Einflüssen nachgegangen, ohne dass eine endgültige Klärung herbeigeführt werden konnte. Die Literatur über *Sorbus* ist spärlich und behandelt diese Fragestellung nicht. Dass Pflanzen nach Kryokonservierung in „Rosettenform“ bleiben, also keine Sprosstreckung, Vermehrung und Bewurzelung ermöglichen, wird auch von *Pyrus* berichtet (OKA et al., 1991, SUZUKI et al., 1987).

Das beschriebene Verhalten der Pflanzen nach Kryokonservierung führt zu der Forderung, dass Kryokonservierungsexperimente erst dann als erfolgreich gelten können, wenn vollständige Pflanzen regeneriert wurden. Die Feststellung der Vitalität 4 Wochen nach dem Auftauen ist unzureichend.

Viele Autoren verwenden das ungefrorene Pflanzenmaterial (sine cryo) als Kontrolle für die Kryokonservierung. OKA et al. (1991) sind der Ansicht, dass Kryokonservierungsexperimente erst dann durchgeführt werden sollten, wenn die „normale“ in vitro Kultur

optimiert ist. Diese Forderung ebenso wie das verwendete Kontrollmaterial ist aus zwei Gründen anzuzweifeln:

1. Es würde bedeuten, dass Knospen sine cryo und post cryo die gleichen Kulturansprüche stellen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass dies nicht der Fall ist.
2. Bei Verwendung von Winterknospen spielt Dormanz eine Rolle. Im ersten Teil dieser Arbeit wird an ungefrorenen Winterknospen (sine cryo) gezeigt, wie deren Regenerationsbereitschaft in Abhängigkeit vom Erntetermin, also Ausprägung der Dormanz, variiert. Im zweiten Teil der Arbeit wird die Regenerationsfähigkeit nach Kryokonservierung (post cryo) in Abhängigkeit vom Erntetermin demonstriert. Die Etablierungsraten zeigen das Optimum für sine cryo Knospen im März und für post cryo Knospen im Januar (sowohl *Pyrus pyraeaster* als auch *Sorbus torminalis*). Daraus lässt sich schließen, dass für die optimierte sine cryo in vitro Kultur die Dormanz weitgehend oder ganz aufgehoben sein sollte, während sie als natürlicher Gefrierschutz für die Kryokonservierung benötigt wird. Es ist daher nicht sinnvoll, für die zwei verschiedenen Verwendungszwecke das gleiche Ausgangsmaterial zu benutzen. Wenn es nicht gleich ist, kann das eine nicht als Kontrolle für das andere dienen. Zu berücksichtigen ist auch, dass die Dormanz durch das Einwirken der tiefen Kryokonservierungstemperaturen zum Teil aufgehoben wird. Darauf lassen die Januar-Ergebnisse von *Pyrus pyraeaster* schließen, die post cryo höher liegen als sine cryo. Dies erschwert die Vergleichbarkeit zusätzlich.

Wenn die Kryokonservierung die Dormanz beeinflusst und die Dormanz die Regenerationsbereitschaft, stellt sich die Frage, wie die Kontrollen für die Kryokonservierung beschaffen sein sollten. Sinnvoll wären Kontrollen, die physiologisch dem aufgetauten Material gleich sind. Um das feststellen zu können, müsste die Dormanz quantitativ erfassbar sein. Dann wäre die Kontrolle diejenige, deren sine cryo Wert dem post cryo Wert der Probanden entspricht. Alternativ wäre es vorstellbar, Marker für die verschiedenen Phasen der Dormanz zu suchen. Die Schwierigkeit besteht darin, dass „Dormanz“ lediglich ein Ausdruck für den Zustand der Wachstumsunterbrechung, der durch eine Vielzahl von Faktoren endogen reguliert und durch die Umwelt beeinflusst wird, ist (LARCHER, 1995). Die Beschreibung der verschiedenen Phasen dieser Wachstumsunterbrechung erfolgt je nach Autor unterschiedlich. Anders als KRAMER and KOZLOWSKI (1979) (siehe oben), orientiert sich CHAMPAGNAT (1989) bei Bäumen und Knollen; aber nicht bei Samen, an den Dormanz-auslösenden Faktoren: 1. Ungünstige Umweltbedingungen wie z. B. niedrige Temperaturen, führen zu „ruhenden“ Knospen („quiescent“). 2. Korrelative Hemmung durch andere Organe oder Teile der Pflanzen, wie z.B. apikale Dominanz, nennt er je nach Abstand zur betroffenen Knospe „long distance correlative inhibitions (LDIs)“ oder „short distance correlative inhibitions (SDIs)“. 3. Wenn Faktoren innerhalb der Knospen bewirken, dass die Knospen in Ruhe bleiben, obwohl alle umweltbedingten und korrelativen Hemmungen beseitigt sind, werden die Knospen „dormant“ genannt. Äußerlich ist den Knospen nicht anzusehen, wodurch ihr Ruhezustand ausgelöst wurde. Zwar sind bei der Bearbeitung einzelner Knospen im Labor unter optimierten Umweltbedingungen die Faktoren 1 und 2 ausgeschaltet, aber es ist unbekannt, ob und wie lange sie nachwirken. Der Versuchsansteller weiß somit nicht exakt, worauf die beobachtete Austriebshemmung beruht. Für die Kryokonservierung wäre dieses Wissen aber von großem Nutzen, da der natürliche Gefrierschutz vermutlich nur durch die Faktoren 1 und 3, Umwelteinflüsse und „echte Dormanz“, aber nicht durch korrelative Hemmungen hergestellt wird.

Es bleibt offen, ob die verschiedenen Faktoren verschiedene Stoffwechselvorgänge auslösen, bzw. beeinflussen. Unter der Hypothese, dass dies der Fall ist, kann man nur durch die Ermittlung mehrerer Parameter eine quantitative Charakterisierung der Ruhephase erwarten. Der Versuch dazu wurde mehrmals unternommen. Untersuchungen über die Veränderungen

der Stoffwechselwege und -aktivitäten beim Übergang vom Wachstum in die Ruhephase sind zahlreich. Sie betreffen den Zucker- / Stärkehaushalt, die Aminosäuren, Nukleinsäuren und Proteine (hier vor allem die Membran-Proteine), Fettsäuren (das Verhältnis ungesättigter zu gesättigten Fettsäuren), Abszissinsäure und andere Hormone. Da die Dormanz zeitlich mit der Frostresistenz mehr oder weniger zusammenfällt, finden sich Untersuchungen sowohl bei Wachstum-Physiologen als auch bei Kryo-Physiologen. Eine schematische Übersicht über phänologische und resistenzphysiologische Vorgänge geben LYR et al. (1992).

Dennoch mangelt es an Modellen, die diese Vielzahl von Einzelfaktoren so zueinander in Beziehung setzen, dass mit einigen wenigen Merkmalen die einzelnen Stadien der Pflanzen charakterisiert werden können. Einen Versuch hierzu hat CHAMPAGNAT (1989) an Hand des Nucleotid-Metabolismus (ATPase-Aktivität und NTP-Synthese) unternommen. Dies ist aber bei keiner der nachfolgend publizierten Arbeiten aufgegriffen worden.

In dieser Arbeit wurde bei *Prunus avium*–Winterknospen das Fehlen jeglicher Kryotoleranz festgestellt. In der Literatur zur Kryokonservierung von *Prunus avium* kommt nur in vitro Material vor. SUZUKI (1993) verwendete Apices, die nach Vorbehandlung langsam kontrolliert eingefroren wurden. Ausgehend von 9 Sorten mit 132 Apices gelang es, 10 Apices zur Sprossbildung zu bringen, aber nur 1 Pflanze bis zur Akklimatisierung. Im Gegensatz zu diesem schlechten Ergebnis publizierten ROEPSTORFF et al. (1997) Folgendes: Die in vitro Sprossspitzen von *Prunus jamasakura* (1 Sorte), *P. lannesiana* (2 Sorten) und *P. avium* (5 Sorten) wurden erst vorbehandelt und nach Vitrifizierung mit PVS2 direkt eingefroren. Die Überlebensraten, nachgewiesen durch Sprossbildung nach vier Wochen, betrugen zwischen 40% und 93%. Alle sind weitergewachsen, konnten nach 4 Monaten bewurzelt und ins Gewächshaus gebracht werden. Es wurden keine Abnormalitäten beobachtet. Interessanterweise wurde die PVS2-Einwirkung (ohne Kryokonservierung) bis 90 Minuten ohne Wachstumsdepression vertragen. Bei längerer Einwirkung sank die Wachstumsrate bis 30% bei 150 Minuten. Auch die Gefrierschutzwirkung von PVS2 begann erst ab 45 Minuten und war optimal bei 90 und 105 Minuten, also der Einwirkungsdauer, bei der PVS2 ohne Kryokonservierung anfängt zu schädigen. Bei den eigenen Arbeiten der Autorin waren die untersuchten Wildbirnen schon nach 10 Minuten PVS2 –Einwirkung geschädigt. HELLIOT und DE BOUCAUD (1997) haben die *Prunus*-Unterlage Ferlenain nach Kältevorbehandlung und PVS2-Vitrifizierung mit der langsamen Kühlrate von 5°C/min eingefroren. Die PVS2-Einwirkungsdauer von 90 Minuten (länger wurde nicht getestet) war am besten. Die Wachstumsraten wurden nach 1 Monat ermittelt und lagen zwischen 5% und 60%. Es fehlen Angaben über den weiteren Kulturverlauf. Diese drei Publikationen zeigen, dass die Kryokonservierung von *Prunus* möglich ist. Aber im Vergleich zu *Pyrus* ist dies sehr wenig, obwohl die Bedeutung von *Prunus* in Obstbau und Holzindustrie viel größer ist als von *Pyrus*.

Es liegen keine Veröffentlichungen über die Kryokonservierung von *Prunus*-Winterknospen vor, was ein Indiz dafür sein könnte, dass diese als Ausgangsmaterial nicht geeignet sind. Die Ursache könnte in einer geringeren natürlichen Frosthärte als bei *Pyrus pyraeaster* und *Sorbus torminalis* liegen. SAKAI (1973) führt die unterschiedliche Frosthärte verschiedener Baumarten darauf zurück, dass sie in unterschiedlichem Maß (Ausmaß und Geschwindigkeit) extrazelluläres Wasser in dem Temperaturbereich 0° bis –10°C (teilweise bis –20°C) ausfrieren, was Voraussetzung für die Toleranz tieferer Temperaturen ist, die nur überlebt werden, wenn die Knospen ausreichend dehydriert sind.

Es stellt sich die Frage, was „ausreichend“ ist. SUZUKI et al. (1997) haben Winterknospen von *Pyrus communis* bis 41% dehydriert und zwischen 50% und 93% Anwachsrate erzielt. Bei stärkerer Dehydrierung verschlechterten sich die Anwachsrate. Bei 20% wuchsen noch 5%. NIINO et al. (1995) geben für *Morus* 39% Wassergehalt an. Die anderen Autoren machen keine Angaben.

Eine andere Möglichkeit, Temperaturen bis ca. $-20 / -30^{\circ}\text{C}$ zu überleben, ist durch Unterkühlungsmechanismen gegeben wie z.B. bei *Malus* (BURKE et al., 1976). Wenn dies die Winter-Strategie von *Prunus* wäre, wäre es notwendig, eine andere Vorgefriereschwindigkeit und / oder -temperatur einzusetzen, um die Unterkühlung zu umgehen und stattdessen das Gefrieren des extrazellulären Wassers zu erreichen und die Knospen ausreichend zu dehydrieren. Wenn aber *Prunus* natürlicherweise wenig oder kein extrazelluläres Wasser ausfriert, kommt die Möglichkeit in Betracht, dass das Gewebe Dehydrierung gar nicht verträgt. Dann läge keine Kryo-Intoleranz vor, sondern Dehydrierungs-Intoleranz. Das würde erklären, warum die eingesetzte Kryokonservierungsstrategie, die auf Dehydrierung basiert, nicht gelang, aber die in der Literatur beschriebene Kryokonservierung von in vitro Material, basierend auf Vitrifizierung, erfolgreich war.

Trotz der beschriebenen, noch vorhandenen Probleme ist die Verwendung von Winterknospen für die Kryokonservierung von Bäumen als vorteilhaft anzusehen. Die Methode ist technisch so einfach und billig, wie es für die Praxis einer Genbank gefordert wird. Ein zusätzlicher Vorteil liegt darin, dass keine genetischen Veränderungen durch toxische Gefrierschutz-Additiva ausgelöst werden können. Es wäre wünschenswert, wenn die Methode optimiert würde. Ansätze dafür sind: Prüfen des Dehydrierungs-Zustands und Anpassung von Einfrier-Geschwindigkeit und End-Temperatur des Vorgefrierens. Prüfung des Einflusses der post cryo Behandlung, wie z.B. die Re-Hydrierung der Knospen in einer feuchten Kammer beim Auftauen.

Die Autorin hofft, dass diese Arbeit mehr Mut zur Kryokonservierung macht und dazu beiträgt, dass diese Methode auch in Deutschland verstärkt zur Erhaltung und Nutzung genetischer Ressourcen eingesetzt wird.

5. Literaturverzeichnis

- AID (Auswertungs- und Informationsdienst für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten), 1990: Forstliches Saat- und Pflanzgut, Gewinnung und Vertrieb. Band 1164
- Åkermann, Å., 1927: Studien über den Kältetod und die Kälteresistenz der Pflanzen. Berlingska Boktryckeriet, Lund, Schweden, S. 1 - 232
- Anonym, 1993: Gesetz zu dem Übereinkommen vom 5. Juni 1992 über die biologische Vielfalt, Bonn, BGBl. Teil II, Z1998A(32): S. 1741 - 1770
- Anonym, 1998: Bericht der Bund-Länder-Arbeitsgruppe „Erhaltung forstlicher Genressourcen“ 1996 - 1997. Hessische Forstliche Versuchsanstalt, Abteilung Forst-Genressourcen. 133 S.
- Arillaga, I. and J. Segura, 1992: Adventitious shoot regeneration from hypocotyl cultures of service tree (*Sorbus domestica* L.). Journal of Horticultural Science 67 (3), S. 371 - 373
- Arillaga, I., T. Marzo and J. Segura 1991: Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L.. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, S. 341 - 348
- Bailly, O. and J. C. Mauget, 1989: Physiological correlations and bud dormancy in the apple tree (*Malus domestica* Borkh.). In: E. Dreyer et al. (eds.): Forest Tree Physiology. Ann. Sci. For. 46 suppl., Elsevier/INRA, S. 220 - 222
- Bajaj, Y. P. S., (ed.), 1986 - 2001: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Volumes 1 – 48. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Bartetzko, H., 1909: Untersuchungen über das Erfrieren von Schimmelpilzen. Jahrbuch der wissenschaftlichen Botanik 47, S. 57 - 98
- Behm, A., A. Becker, H. Dörflinger, A. Franke, J. Kleinschmit, G. H. Melchior, H. J. Muhs, H. P. Schmitt, B. R. Stephan, U. Tabel, H. Weisgerber, and T. Widmaier, 1997: Concept for the Conservation of Forest Genetic Resources in the Federal Republic of Germany. Silvae Genetica 46, S. 24 - 34
- Benson, E. E., 1994: Cryopreservation. In: Dixon, R. A. (ed.): Practical Plant Cell Culture: A Practical Approach. IRL press, Oxford. Chapter 7, S. 147 - 166
- Benson, E. E., 1999: An Introduction to Plant Conservation Biotechnology. In: Benson, E. E. (ed): Plant Conservation Biotechnology. Taylor & Francis, London. S. 3 - 10
- Bettencourt, E. and J. Konopka, 1989: Temperate Fruits and Tree Nuts. 6.II. IPGRI Publication, Rome. 38 S.
- Bhojwani, S.S., K. Mullins and D. Cohen, 1984: In vitro propagation of *Pyrus pyrifolia*. Sci Hort 23, S. 247 – 254

- BMELF, 2000: Forstwirtschaft und Biologische Vielfalt. Strategie zur Erhaltung und nachhaltigen Nutzung der biologischen Vielfalt in den Wäldern Deutschlands. Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Januar 2000. 25 S.
- Brockhaus, 1996: Die Enzyklopädie in 24 Bänden. 20. Auflage. Verlag F. A. Brockhaus Leipzig, Mannheim. Band 22 Them – Valk, S. 627 - 628
- Büttner, R., 1998: Die Wildbirne – Baum des Jahres 1998. Erwerbsobstbau 40, S. 66 - 68
- Bund-Länder-Arbeitsgruppe “Erhaltung forstlicher Genressourcen”, 1989: Konzept zur Erhaltung forstlicher Genressourcen in der Bundesrepublik Deutschland. Forst und Holz (44): S. 379 - 404
- Burke, M. J., H. A. Quamme, C. J. Weiser and P. H. Li, 1976: Freezing and Injury in Plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 27, S. 507 - 528
- Chalupa, V., 1983: Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. Comm Inst For Cech 13, S. 7 - 39
- Chalupa, V., 1987: European Hardwoods. In: Bonga, J. M. and Durzan, D. J. (eds): Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3. Martinus Nijhoff Publishers. S. 224 - 246
- Champagnat, P., 1989: Rest and activity in vegetative buds of trees. In: E. Dreyer et al. (eds.): Forest Tree Physiology. Ann. Sci. For. 46 suppl. Elsevier/INRA, S. 9-26
- Chang, Y. and B.M. Reed, 1999: Extended cold acclimation and recovery medium alternation improve regrowth of Rubus shoot tips following cryopreservation. Cryo-Letters 20, S. 371 - 376
- Chang, Y. and B.M. Reed, 2000: Extended Alternating-Temperature Cold Acclimation and Culture Duration Improve Pear Shoot Cryopreservation. Cryobiology 40, S. 311 - 322
- Chang, Y. and B. M. Reed, 2001: Preculture conditions influence cold hardiness and regrowth of *Pyrus cordata* shoot tips after cryopreservation. HortScience 36: 1329 - 1333
- Cheng, Ch.-Y., G. Reuther und W. Gruppe, 1974: Untersuchungen zur Regulation der Knospenruhe verschiedener Rebsorten durch ökologische und endogene Faktoren. VITIS 13, S. 98 - 111
- Cheng, T.Y., 1979: Micropropagation of clonal fruit tree rootstocks. Compact Fruit Trees 12, S. 127 - 137
- Chevreau, E., B. Thibault and Y. Arnaud, 1992: Micropropagation of Pear (*Pyrus communis* L.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed): Biotechnology in Agriculture and Forstry, vol. 18: High-Tech and Micropropagation II, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 244 - 261
- Damiano, C., E. Caboni, A. Frattarelli, M. Giorgioni, M. Liberali, P. Lauri and S. D’Angeli, 2000: Innovative Micropropagation of temperate fruit trees: The case of pear. In: Cassels, A. C. (ed): Proceedings of the international Symposium on Methods and Markers for quality assurance in micropropagation. Cork, Ireland 24 – 27 August 1999. Acta Horticulturae 530, S. 181 - 185

- Debergh, P., N. Topoonyanont, J. van Huylenbroeck, H. Moreira da Silva and E. Oyaert, 2000: Preparation of microplants for *ex vitro* establishment. In: Acta Horticulturae 530, S. 269-275.
- Dereuddre, J., C. Scottez, Y. Arnaud and M. Duron, 1990: Effets d'un endurcissement au froid des vitroplants de poirier (*Pyrus communis* L. cv. Beurre Hardy) sur la resistance des apex axillaires a une congelation dans l'azote liquide. Comptes Rendus De L'Academie Des Sciences. Series 3, Sciences De La Vie 310 (6), S. 265 - 272
- Dereuddre, J., D. Bertrand, M. Brison, 1994: Cryopreservation of fruit tree somatic embryos and shoot tips. Animal and Plant Genetic Resources: Methodologies of Investigation and Management. Proceedings of a Conference held on 28 – 30 September 1993 at Montpellier, France. S. 279 - 290
- Dirr, M. A. and C. W. Heuser jr., 1987: The Reference Manual of Woody Plant Propagation: From Seed to Tissue Culture. Varsity Press, Athens, Georgia, 239 S.
- Driver, J. A. and G. R. L. Suttle, 1987: Nursery Handling of Propagules. In: Bonga, J. M. and D. J. Durzan (eds): Cell and Tissue Culture in Forestry. Volume 2 Specific Principles and Methods: Growth and Developments. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, NL. S. 320 - 335
- Druart, Ph. and R. Gruselle, 1986: Plum (*Prunus domestica*). In: Bajaj, Y.P.S. (ed.) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 1 Trees, Springer, Berlin. S. 130 - 154
- Duhamel de Monceau, H. L., 1741: Observations Botanico-Météorologiques pour l'annee 1740. Mem. Math. Phys. Acad. Roy. Sci (Paris), S. 149 – 171
- Duhoux, E. und D. Davies, 1985: Caulogénèse à partir des Bourgeons cotylédonaire d'*Acacia albida* et Influence de Saccharose sur la Rhizogénèse. J. Plant Physiol. 121, S. 175 - 180
- Engelmann, F., 1998: In vitro conservation of horticultural genetic resources: Review of the state of the art. World Conference on Horticultural Research, 17 - 20 June, 1998, Rome, Italy, 12 S.
- Franck, T., T. Gaspar and J. F. Hausman, 1998: Rooting response of several clones of *Sorbus domestica* L.. In: COST 822 "Development of integrated systems for large-scale propagation of elite plants using in vitro techniques." Report of activities, S. 448
- Gebhardt, K. und A. Meier-Dinkel, 1998: In-vitro-Vermehrung von Wildbirne. In: Kleinschmit, J. et al. (eds): Die Wildbirne, *Pyrus pyraster* (L.) BURGSD. Tagung zum Baum des Jahres am 17. und 18.3.1998 in Göttingen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 125, S. 104 - 109
- Gebhardt, K., M. Golde und I. Zachow, 1996: Mikrovermehrung von Wildäpfeln und Wildbirnen. Poster P-11.004 in: Abstracts Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Düsseldorf 25. bis 31. August 1996, S. 268

- George, E. F., 1993: Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd., Basingstoke, England. S. 212
- Göppert, H. R., 1830: Über die Wärme-Entwicklung in den Pflanzen, deren Gefrieren und die Schutzmittel gegen dasselbe. Max and Comp, Berlin, Breslau. 272 S.
- Gruppe, W., Ch.-Y. Cheng und G. Reuther, 1975: Knospenruhe und Knospenaustrieb bei Kirschen und Pflaumen. Gartenbauwissenschaft 3, S. 97 - 105
- Hedtrich, C. M., 1977: Differentiation of cultivated leaf discs of *Prunus mahaleb*. Acta Horticulturae 78, S. 177 - 183
- Helliot, B. and M. T. de Boucaud, 1997: Effect of Various Parameters on the Survival of Cryopreserved *Prunus Ferlenain* *in Vitro* Plantlets Shoot Tips. Cryo-Letters 18, S. 133 - 142
- Hildreth, A. C., 1926: Determination of hardiness in apple varieties and the relation of some factors to cold resistance. Minnesota Agr. Expt. Sta., Tech. Bull. 42.
- Hoffmann, H., 1857: Witterung und Wachsthum, oder Grundzüge der Pflanzenklimatologie. Leipzig, S. 312 - 334
- Hunter, J., 1775: Experiments on animals and vegetables, with respect to the power of producing heat. Phil. Trans. Roy. Soc. 65, S. 446 - 458
- Jacquot [Gautheret (1959)] La Culture des Tissus Vegetaux. Masson et Cie, Paris. In: George, E. F. (ed.), 1993: Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1 The Technology. Exegetics Ltd., Basingstoke, England. 574 S.
- Jambor-Benczur, E., K. Onadi, Z. Szafian, E. Batiz and G. Schmidt, 1996: The effect of growth regulators and carbon source on *in vitro* multiplication of *Sorbus rotundifolia* L.. In: COST 822 „Physiology and Control of Plant Propagation in vitro“, Proceedings of the workshop held at the Humboldt University, Berlin. S. 77 - 84
- Jesch, H.-H. und P. Musche, 1991: Höhere Effektivität der In-vitro-Vermehrung von Ziergehölzen der Gattung *Prunus*. Gartenbau (38) 4, S. 33 - 34
- Kartha, K. K., 1985: Cryopreservation of Plant Cells and Organs. CRC Press, Boca Raton, USA. 158 S.
- Kausch-Blecken von Schmeling, W., 1998: Das Holz der Wildbirne (*Pyrus pyraster*). In: Kleinschmit, J. et al. (eds): Die Wildbirne, *Pyrus pyraster* (L.) BURGSD. Tagung zum Baum des Jahres am 17. und 18.3.1998 in Göttingen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 125, S. 45 - 48
- Keller, E. R. J., 2002: Cryopreservation of *Allium sativum* L. (Garlic). In: Towill, L. E. and Y. P. S. Bajaj (eds): Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 50, Cryopreservation of Plant Germplasm II. Springer Verlag Heidelberg, S. 37 - 47

- Kleinschmit, J., 1998: Die Wildbirne – Baum des Jahres 1998. Forst und Holz 53 (2), S. 35 - 39
- Kramer, P. J. and T. T. Kozlowski, 1979: Physiology of woody plants. Acad. Press Inc., New York, S. 563
- Kyte, L. and J. Kleyn, 1999: Plants from Test Tubes. Timber Press, Portland, USA, 240 S.
- Lane, W. D., 1979: Regeneration of pear plants from shoot meristem tips. Plant Sci Let 16, S. 337 - 342
- Lane, W. D., 1982: Plant manipulation in vitro with hormones. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc. 1981, 31, S. 101 - 108
- Larcher, W. und A. Eggarter, 1960: Anwendung des Triphenyltetrazoliumchlorids zur Beurteilung von Frostschäden in verschiedenen Achsengewebe bei *Pyrus*-Arten und Jahresgang der Resistenz. Protoplasma 51, S. 595 - 619
- Larcher, W., 1995: Physiological Plant Ecology. Springer New York. 506 S.
- Levitt, J. 1956: The Hardiness of Plants. Academic Press Inc., New York, N.Y.. 286 S.
- Liberali, M. and C. Damiano, 1997: Micropropagation of *Pyrus communis pyraeaster*. In: Meeting COST 822 Working Group 1 „Physiology and control of plant propagation *in vitro*“ 10-13 September 1997, Cesena, Italien
- Lloyd, G. and B. McCown, 1981: Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Int. Plant Prop. Soc. Proc. 30, S. 421 - 427
- Luyet, B. J., and G. Galos, 1940: The effect of the rate of cooling on the freeze-point of living tissues. Biodynamica 30, S. 1 - 23
- Lyr, H., H. J. Fiedler und W. Tranquillini, 1992: Physiologie und Ökologie der Gehölze. Gustav Fischer, Jena, Stuttgart. 620 S.
- Maene, L., 1985: Optimalisering van de overgang van weefselteeltplantjes naar in vivo omstandigheden. PhD-thesis, University Gent. 221 S.
- Martinez Pulido, C., I.S. Harry and T. A. Thorpe, 1990: In vitro regeneration of plantlets of Canary Island pine (*Pinus canariensis*). Can. J. For. Res. 20, S. 1200 - 1211
- Meier-Dinkel, A., 1986: In vitro Vermehrung ausgewählter Genotypen der Vogelkirsche (*Prunus avium* L.). Allg. Forst- u. J.-Ztg., 157 (7), S. 139 - 144
- Meier-Dinkel, A., 1993: Untersuchungen zur Phasenalterung und zur In-vitro-Vermehrung von Stiel- und Traubeneiche (*Quercus robur* L. und *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). In: Meier-Dinkel, A. et al. (eds.): Beiträge zur In-vitro-Vermehrung und Wurzelentwicklung von Stiel- und Traubeneiche sowie zur Erhaltung forstlicher Genressourcen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 111, S. 9 - 158

- Meier-Dinkel, A., 1990: Vegetativvermehrung von Laubgehölzen am Beispiel von Eiche. In: Schmidt, J. und Wilhelm, E. (eds.), Mikrovegetativvermehrung von Gehölzen. Fachveranstaltung der Arbeitsgruppe Pflanze in der Österreichischen Gesellschaft für Biotechnologie, Kurzfassung der Referate, Verlag: Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf, Institut für Landwirtschaft, Seibersdorf, Österreich: S. 8 - 16
- Meier-Dinkel, A., 1990: Kühlagerung von Gewebekulturen. In: Stephan, B.R. (ed.), Erhaltung forstlicher Genressourcen, Mitteilungen der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft 164: S. 137 - 144
- Meier-Dinkel, A., 1991: Recovery of juvenile characteristics through in vitro propagation of mature fast-growing birch hybrids. In: Ahuja, M. R. (ed.): Woody Plant Biotechnology, NATO ASI Series, Plenum Press, New York, S. 345 - 346
- Meier-Dinkel, A., 1998: In vitro Vermehrung von Speierling (*Sorbus domestica* L.). Corminaria 9, S. 9 - 13
- Merten, H., 2000: Schaufenster unserer Spitzenprodukte. In: Niedersächsisches Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten (ed): Forstwirtschaft in Niedersachsen, Waldinformation 1, S. 10 - 11
- Mi, W. G. and T. Sanada, 1994: Cryopreservation of pear shoot tips in vitro. In: G. Dong and L. Y. Meng: Advances in Horticulture. China Agriculture Press, Beijing, China, S. 6 - 88
- Moreira da Silva, M. H., P.C. Debergh, 1997: The effect of light quality on the morphogenesis of in vitro cultures of *Azorina vidalii* (Wats.) Feer. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51 (3), S. 187 - 193
- Moriguchi, T., T. Akihama and I. Kozaki, 1985: Freeze-preservation of dormant pear shoot apices. Japanese Journal of Breeding, 35 (2), S. 196 - 199
- Morren, C., 1838: Observations anatomiques sur la congélation des organes des végétaux. Bull. acad. roy. sci. belles-lettres Bruxelles 5, S. 65 – 66 und 93 - 111
- Müller-Thurgau, H., 1880: Über das Gefrieren und Erfrieren der Pflanzen. Landwirtschaftliches Jahrbuch 9, S. 133 - 189
- Murashige, T., and F. Skoog, 1962: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15, S. 473 - 497
- Namvar, K. und W. Spethmann, 1985: Die Baumarten der Gattung Sorbus: Vogelbeere, Mehlbeere, Elsbeere und Speierling. Allgemeine Forstzeitschrift 36, S. 937 - 943
- Németh, G., 1979: Benzyladenine-stimulated rooting in fruit-tree rootstocks cultured in vitro. Z. Pflanzenphysiol. 95, S. 389 - 396
- Niino, T., 1993: Cryopreservation of deciduous fruits and mulberry trees. JICA Ref Series 6, S. 53 - 85

- Niino, T. and A. Sakai, 1992: Cryopreservation of in-vitro-grown shoot tips of apple and pear by vitrification. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 28 (3), S. 261 - 266
- Niino, T., K. Shirata and S. Oka, 1995: Viability of Mulberry Winter Buds Cryopreserved for 5 Years at -135°C . *The Journal of Sericultural Science of Japan* 64 (4), S. 370 - 374
- Oka, S., H. Yakuwa, K. Sato and T. Niino, 1991: Survival and shoot formation in vitro of pear winter buds cryopreserved in liquid nitrogen. *HortScience* 26 (1), S. 65 - 66
- Pierik, R. L. M., 1987: *In Vitro Culture of Higher Plants*. Kluwer, Dordrecht, NL, 348 S.
- Powell, L.E., 1970: The aseptic culture of excised apple buds, and their employment in dormancy studies. *Hort Sci* 5, S. 326 (abstr.)
- Reed, B. M., 1990: Survival of in-vitro-grown apical meristems of *Pyrus* following cryopreservation. *HortScience* 25 (1), S. 111 - 113
- Reed, B. M., 1993: Improved survival of in vitro-stored *Rubus* germplasm. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 118, S. 890 - 895
- Reed, B. M., 2001: Implementing cryogenic storage of clonally propagated plants. *CryoLetters* 22, S: 97 - 104
- Reed, B. M. and Y. Chang, 1997: Medium- and long-term storage of in vitro cultures of temperate fruit and nut crops. In: Razdan, M. K. and E. C. Cocking (eds): *Conservation of Plant Genetic Resources In vitro*. Science Publishers, Enfield, NH, USA. Vol. 1, chapter 4, S. 67 - 105
- Reed, B. M. and X. Yu, 1995: Cryopreservation of in vitro grown gooseberry and currant meristems. *Cryo-Letters* 16, S. 131 - 136
- Reed, B. M., J. DeNoma, J. Luo, Y. Chang and L. E. Towill, 1998: Cryopreservation and long-term storage of pear (*Pyrus* L.) genetic resources. *In vitro Cellular and Developmental Biology – Plant* 34, S. 256 - 260
- Riechers, U., 1993: *In-vitro-Kultur der Ericaceae Vaccinium, Rhododendron und Kalmia*. Dissertation Universität Hannover, 158 S.
- Roepstorff, A., T. Niino, K. Tashiro, M. Suzuki, S. Ohuchi, J. Magoshi and T. Akihama, 1997: Cryopreservation of in vitro grown shoot tips of cherry and sweet cherry by one-step vitrification. *Sci. Hort.* 70 (2), S. 155 - 163
- Roloff, A., 1998: Der Baum des Jahres 1998: die Wildbirne (*Pyrus communis* L. ssp. *pyraster* Gams). In: Kleinschmit, J. et al. (eds): *Die Wildbirne, Pyrus pyraster (L.) BURGSD*. Tagung zum Baum des Jahres am 17. und 18.3.1998 in Göttingen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 125, S. 9 - 17
- Sakai, A., 1960: Survival of the Twigs of Woody Plants at -196°C . *Nature*, Vol. 185, S. 393 - 394

- Sakai, A., 1973: A Characteristics of Winter Hardiness in Extremely Hardy Twigs of Woody Plants. *Plant & Cell Physiology* 14, S. 1 - 9
- Sakai, A. and Y. Nishiyama, 1978: Cryopreservation of winter vegetative buds of hardy fruit trees in liquid nitrogen. *HortScience* 13 (3), S. 225 - 227
- Saure, M. C., 1985: Dormancy release in deciduous fruit trees. *Hort. Reviews* 7, S. 239 - 300
- Schäfer-Menuhr, A., E. Müller und G. Mix-Wagner, 1996: Einsatz der Kryokonservierung als Routinemethode für die Erhaltung alter Kartoffelsorten. *Landbauforschung Völkenrode* 2, S. 65 - 75
- Schwartz, C. D., 1937: Rest period responses and cold resistance in the red raspberry in relation to the breeding of hardy varieties. *Research Studies State Collection Washington* 5, S. 42
- Scottez, C., E. Chevereau, N. Gordard, Y. Arnaud, M. Duron and J. Dereuddre, 1991: Cryopreservation of cold acclimated pear shoot tips after encapsulation-dehydration. *Cryobiology* 29, S. 691 - 700
- Senula, A. and E. R. J. Keller, 2000: Morphological characterization of a garlic core collection and establishment of a virus-free in vitro genebank. *Allium Improvement Newsletter* 10, S. 3 - 5
- Short, K. C., J. Warburton and A. V. Roberts, 1987: In vitro hardening of cultured cauliflower and chrysanthemum plantlets to humidity. *Acta Hort.* 212, S. 329-334
- Siminovitch, D. and G. W. Scarth, 1938: A study of the mechanism of frost injury to plants. *Canadian Journal of research* C16, S. 467 - 481
- Singha, S., 1986: Pear (*Pyrus communis*). In: Bajaj, Y.P.S., (ed): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 1: Trees I. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 198 - 206
- Skirvin, R. M., M. Kouider, H. Joung and S. S. Korban, 1986: Apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: Bajaj, Y.P.S., (ed): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 1: Trees I. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 183 - 197
- Soppa, B., 1998: Erfassung und Erhaltung von Wildbirne (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) in Niedersachsen und Schleswig-Holstein durch die Niedersächsische Forstliche Versuchsanstalt. In: Kleinschmit, J. et al. (eds): *Die Wildbirne, Pyrus pyraster* (L.) BURGSD. Tagung zum Baum des Jahres am 17. und 18.3.1998 in Göttingen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 125, S. 49 - 56
- Sriskandarajah, S. and M. G. Mullins, 1982: Induction of adventitious rooting in vitro in difficult-to-propagate cultivars of apple. *Plant Sci Lett* 24, S. 1 - 9
- Suzuki, T., 1993: Basic Studies on Super-Low-Temperature Cryopreservation of Horticultural Plant Tissues. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 18.2, S. 165 - 217

- Suzuki, M., T. Harada and T. Yakuwa, 1987: Studies on freeze-preservation of fruit tree germplasm. I. Survival of pear leaf bud apices frozen in liquid nitrogen. *Memoirs of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 15 (2), S. 118 - 123
- Suzuki, M., T. Niino, T. Akihama and S. Oka, 1997: Shoot formation and plant regeneration of vegetative pear buds cryopreserved at -150°C . *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 66 (1), S. 29 - 34
- Towill, L. E. and P. Mazur, 1975: Studies on the reduction of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures. *Canadian Journal of Botany* 53, S. 1097 - 1102
- Towill, L. E. and Y. P. S. Bajaj (eds): *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 50, *Cryopreservation of Plant Germplasm II*. Springer Verlag Heidelberg, 396 S.
- Tyler, N. J. and C. Stushnoff, 1988: The Effects of Prefreezing and Controlled Dehydration on Cryopreservation of Dormant Vegetative Apple Buds. *Canadian Journal of Plant Sciences*, 68, S. 1163 - 1167
- Verleysen, H., G. Samyn, E. Van Bockstaele and P. Debergh, 2004: Evaluation of analytical techniques to predict viability after cryopreservation. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture* 77 (1), S. 11 - 21
- Wagner, I., 1995: Identifikation von Wildapfel (*Malus sylvestris* (L.) MILL.) und Wildbirne *Pyrus pyraster* (L.) BURGSD. Voraussetzung zur Generhaltung des einheimischen Wildobstes. *Forstarchiv* 66 (2), 39 - 47
- Wagner, I., 1998: Evaluierung der Wildformen von Apfel und Birne. In: Kleinschmit, J. et al. (eds): *Die Wildbirne, Pyrus pyraster* (L.) BURGSD. Tagung zum Baum des Jahres am 17. und 18.3.1998 in Göttingen. Schriften aus der Forstlichen Fakultät der Universität Göttingen und der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt. Band 125, S. 68 - 82
- Waldenmaier, S., 1991: Vermehrungsverfahren für *Syringa* unter Verwendung der in-vitro-Kultur. Dissertation Universität Hannover, 142 S.
- Wiegand, K. M., 1906: Some studies regarding the biology of buds and twigs in winter. *Botan. Gaz.* 41, S. 373 - 424
- Winkler, A., 1913: Über den Einfluss der Aussenbedingungen auf die Kälteresistenz ausdauernder Gewächse. *Jahrbuch der wissenschaftlichen Botanik* 52, S. 467 - 506
- Yamada, T., A. Sakai, T. Matsumura and S. Higuchi, 1991: Cryopreservation of apical meristems of white clover (*Trifolium repens* L.) by vitrification. *Plant Science* 78, S. 81 - 87

ANHANG



Abb. 28 *Pyrus pyraeaster*, Klon 59-2. Multiple Sprossbildung in vitro. Der längste Spross ist ca. 3 cm lang.

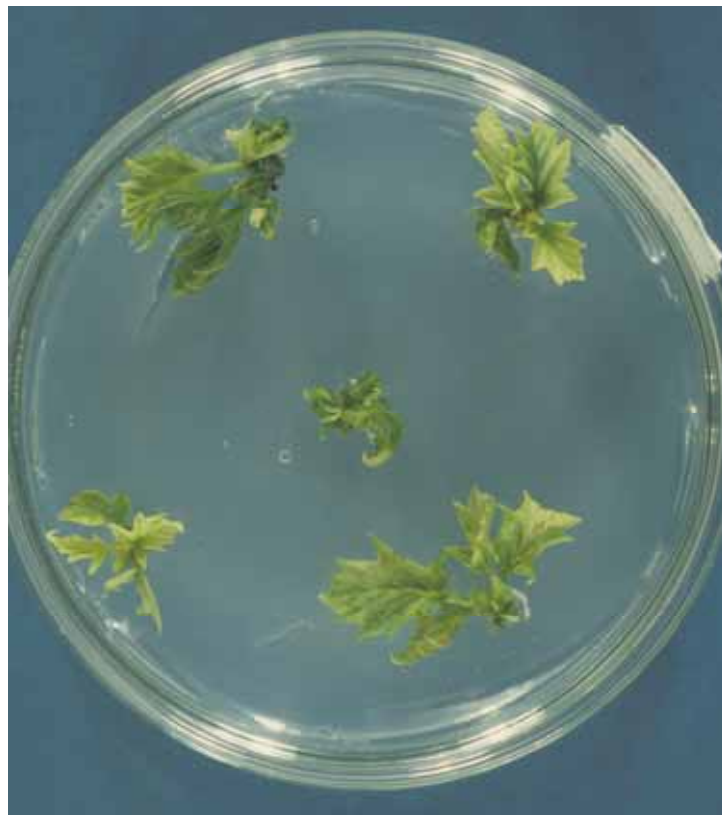


Abb. 29 *Sorbus torminalis*, Klon 1077-4. Beginnendes Wachstum der Apices, 6 Wochen nach Präparation aus Winterknospen. Die größten Blätter sind ca. 1 cm lang.



Abb. 30 *Pyrus pyraaster*. Bewurzelter Mikrosteckling, vorbereitet für das Pikieren.



Abb. 31 *Sorbus torminalis*. Bewurzelte Mikrostecklinge, vorbereitet für das Pikieren.



Abb. 32 *Sorbus torminalis*, Klon 126-1 nach in vitro Kultur. Getopfte Pflanzen im 1. Jahr nach dem Pikieren.



Abb. 33 *Pyrus pyraeaster*, Klon 59-2 nach in vitro Kultur. Pflanzen im Container im 2. Jahr nach dem Pikieren.



Abb. 34 *Pyrus pyrausta*. Gefrorene Reiser mit Winterknospen in der Kryobox (13 x 13 cm), direkt nach der Entnahme aus Flüssigstickstoff, daher weiß bereift.



Abb. 35 *Pyrus pyrausta*. Apex aus einer Winterknospe nach Kryokonservierung, 2 Wochen nach der Präparation. Länge: 2 – 3 mm.



Abb. 36 a



Abb. 36 b



Abb. 36 c



Abb. 36 d

Abb. 36 TTC-gefärbte Winterknospen im Längsschnitt. Deutlich ist die Rotfärbung im Bereich des Apex als Zeichen von Vitalität erkennbar. Skalierung der Abbildungen b und d in mm.

- a *Prunus avium* ohne Kryokonservierung
- b *Prunus avium* nach Kryokonservierung
- c *Pyrus pyraeaster* ohne Kryokonservierung
- d *Pyrus pyraeaster* nach Kryokonservierung

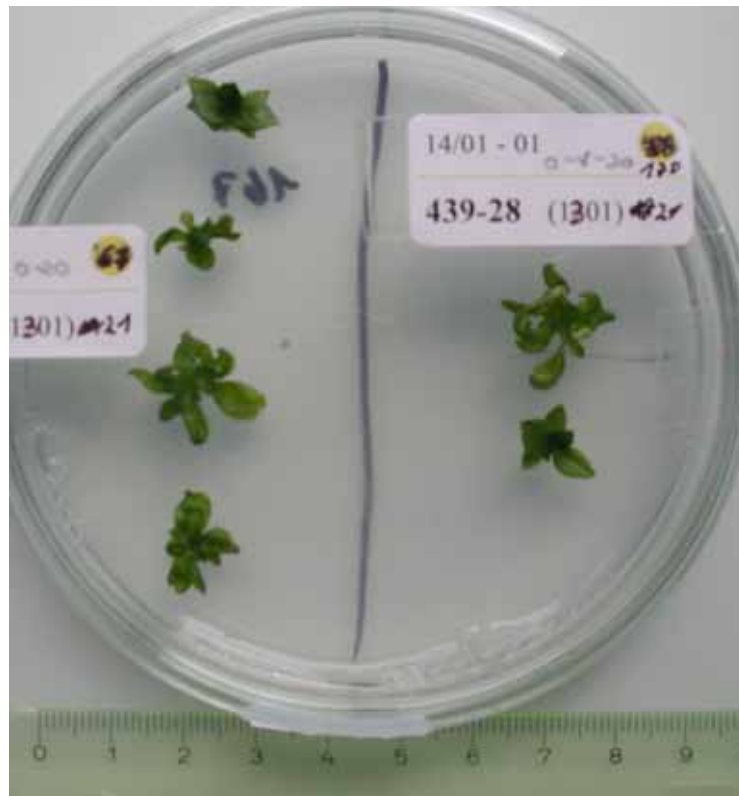


Abb. 37 *Pyrus pyraester*, Klon 439-28. 4 Explantate mit beginnender Sprossregeneration, 2 mit entfalteten Blättern (oben links) nach Kryokonservierung von in vitro Achselknospen (vgl. Tab. 33 in Kapitel 3.2.1.2.3)

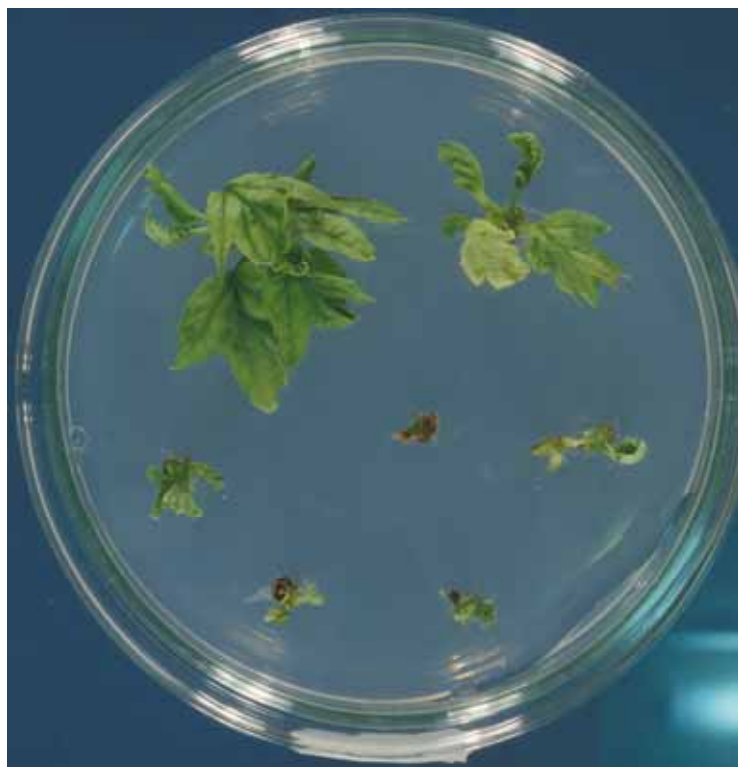


Abb. 38 *Sorbus torminalis*, Klon 126-2. Beginnende Sprossregeneration bei 2 Explantaten (oben) nach Kryokonservierung von Winterknospen, 5 Explantate erst mit beginnender Entfaltung der Blätter.

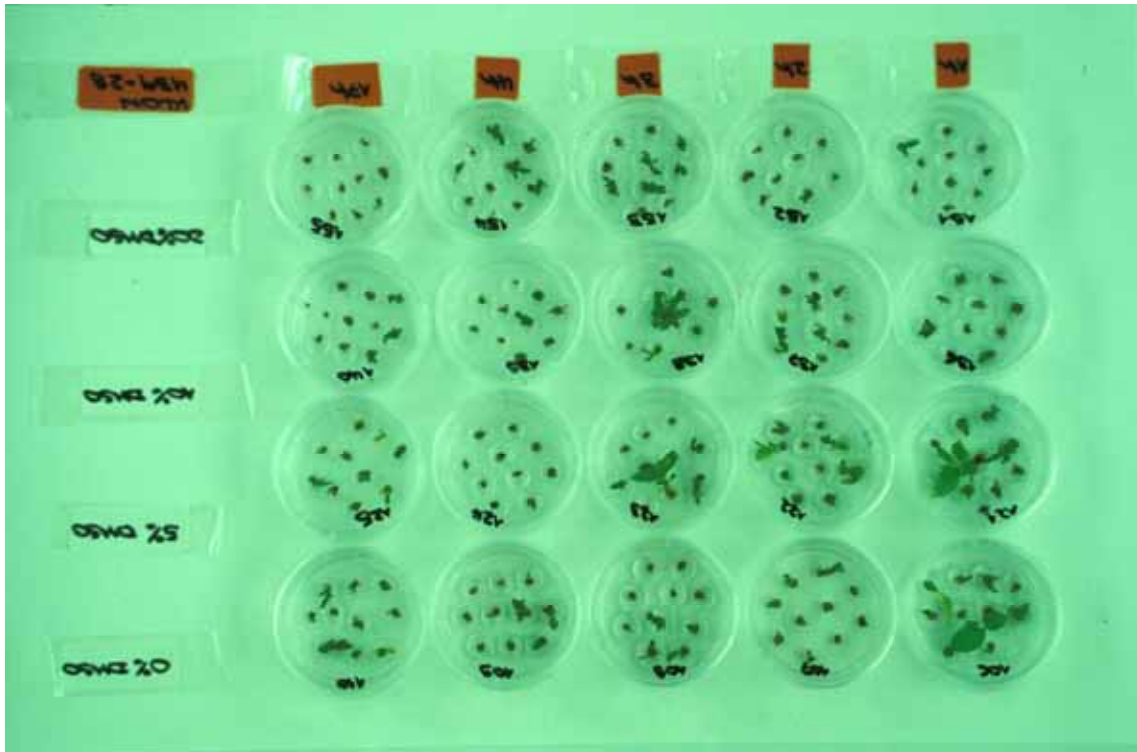


Abb. 39 *Pyrus pyraeter*, Klon 439-28. Apices auf Agarosetropfen. Versuch zur Toxizität von DMSO: von oben nach unten: 20%, 10%, 5%, 0% DMSO, von rechts nach links: 1, 2, 3, 4, 17 Stunden Einwirkzeit. Jede Petrischale entspricht einer Versuchsvariante.

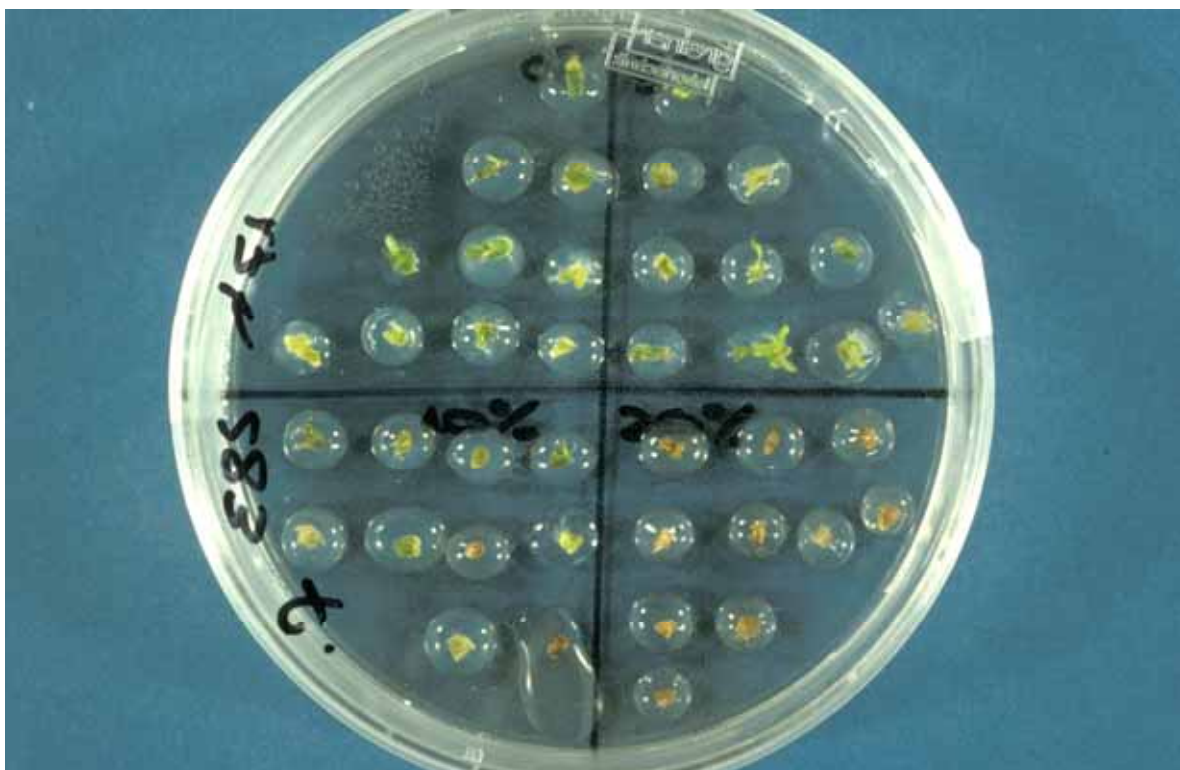


Abb. 40 *Sorbus torminalis*, Klon 283. Apices in Alginatkugeln. Versuch zur Toxizität von DMSO. 17 Stunden Einwirkzeit mit 4 verschiedenen DMSO-Konzentrationen: 0%, 5%, 10%, 20% DMSO (gegen den Uhrzeigersinn von rechts oben beginnend).

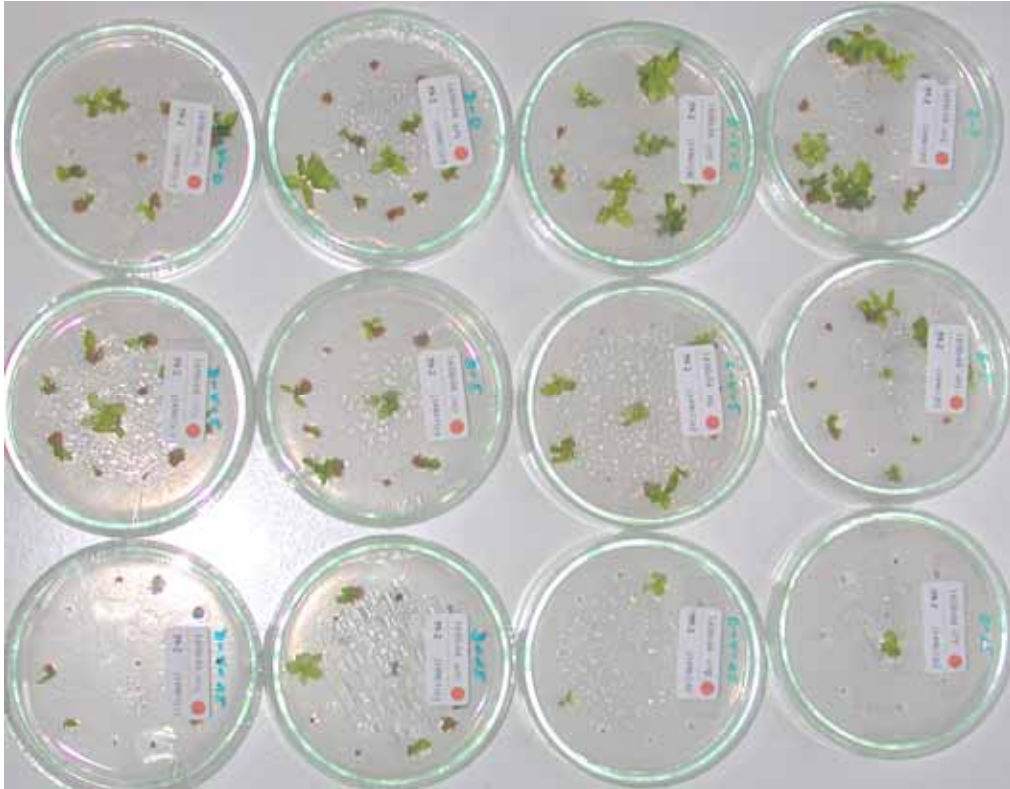


Abb. 41 *Pyrus pyraeaster*, Klon 59-2. Vorbehandlungskombinationen entsprechend Versuchsplan Tab. 32, ohne Kryokonservierung. Varianten 1 – 12, je 1 Petrischale (von oben nach unten, von rechts nach links). Die Explantate der Varianten 3, 6 und 12 sind deutlich geschädigt.

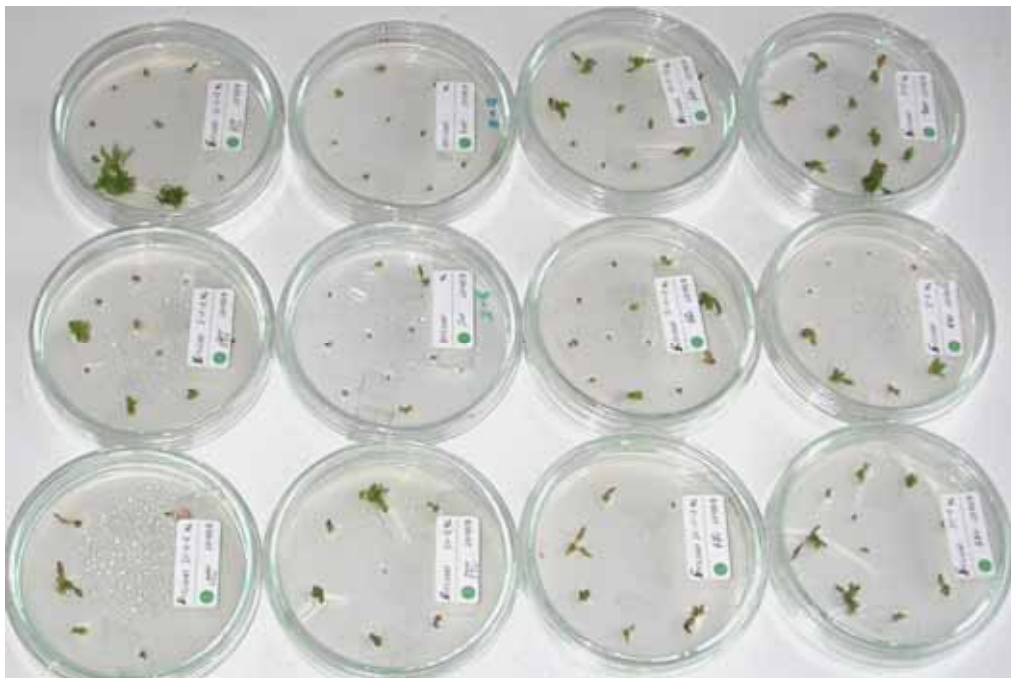


Abb. 42 *Sorbus torminalis*, Klon 76. Vorbehandlungskombinationen entsprechend Versuchsplan Tab. 32, ohne Kryokonservierung. Varianten 1 – 12, je 1 Petrischale (von oben nach unten, von rechts nach links). Mehrere Explantate der Varianten 3, 4, und 10 wachsen bereits.

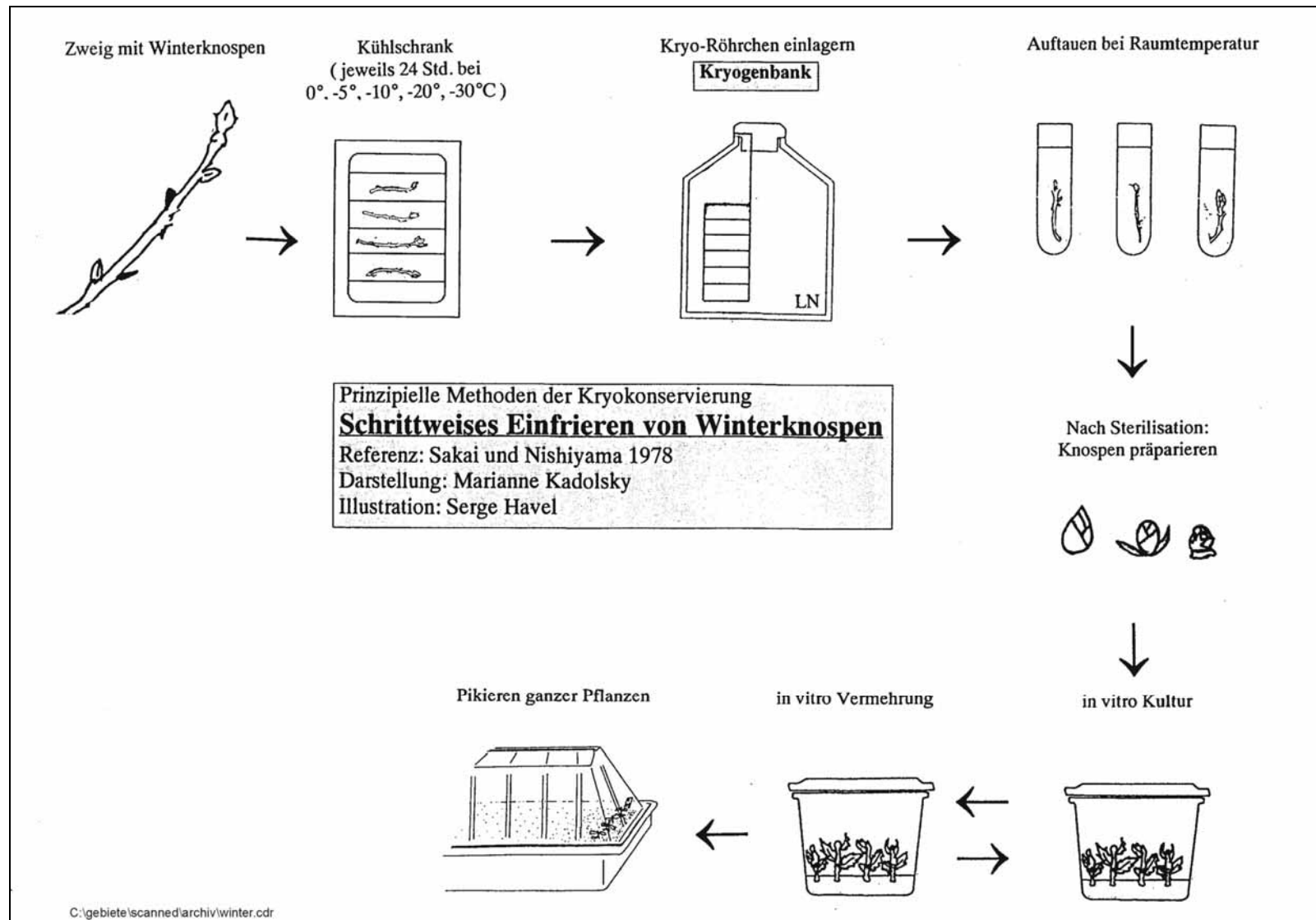


Abb. 43 Fließschema der Kryokonservierung von Winterknospen.

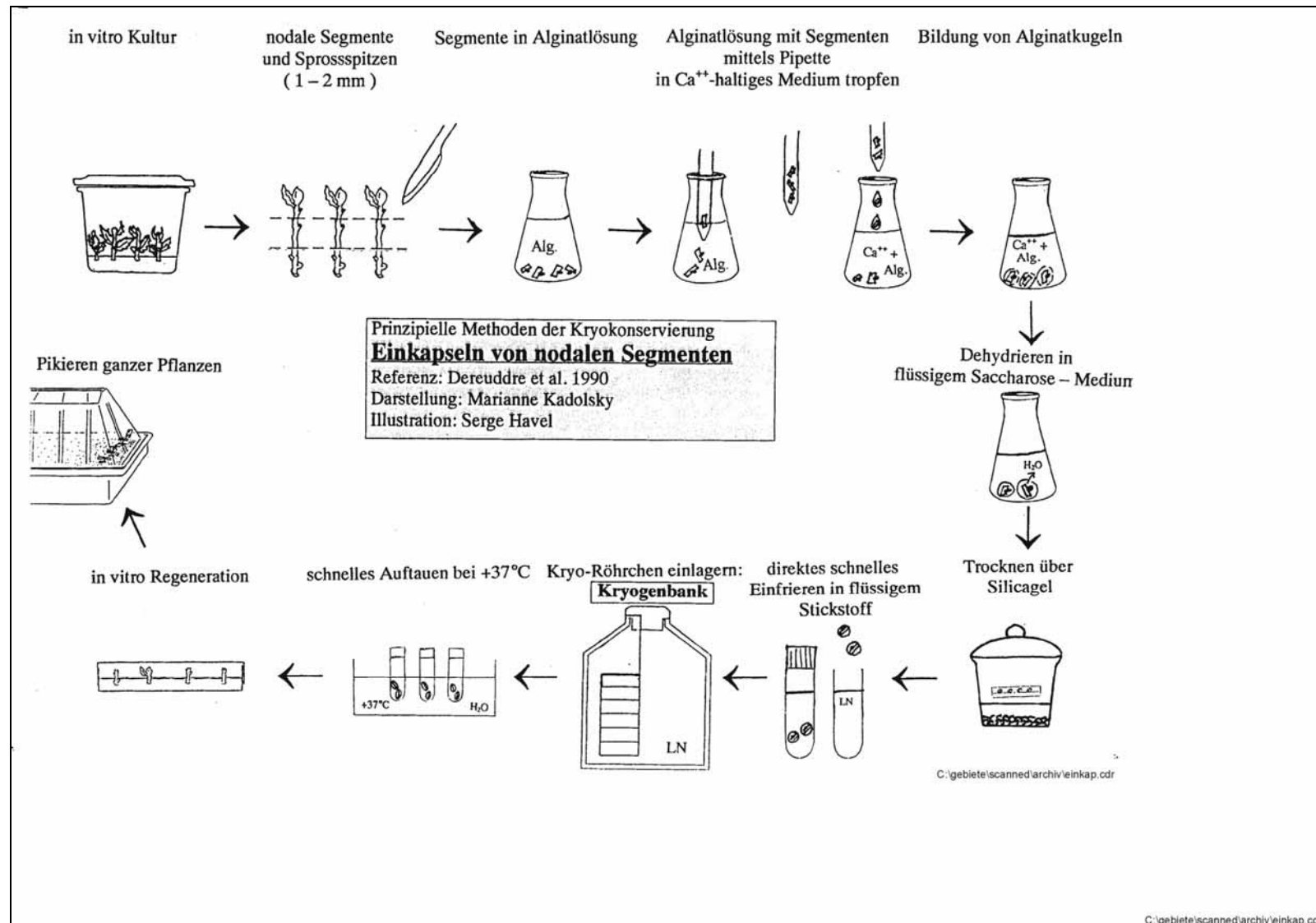


Abb. 44 Fließschema der Kryokonservierung mittels Einkapselung von in vitro Material in Alginatkugeln.

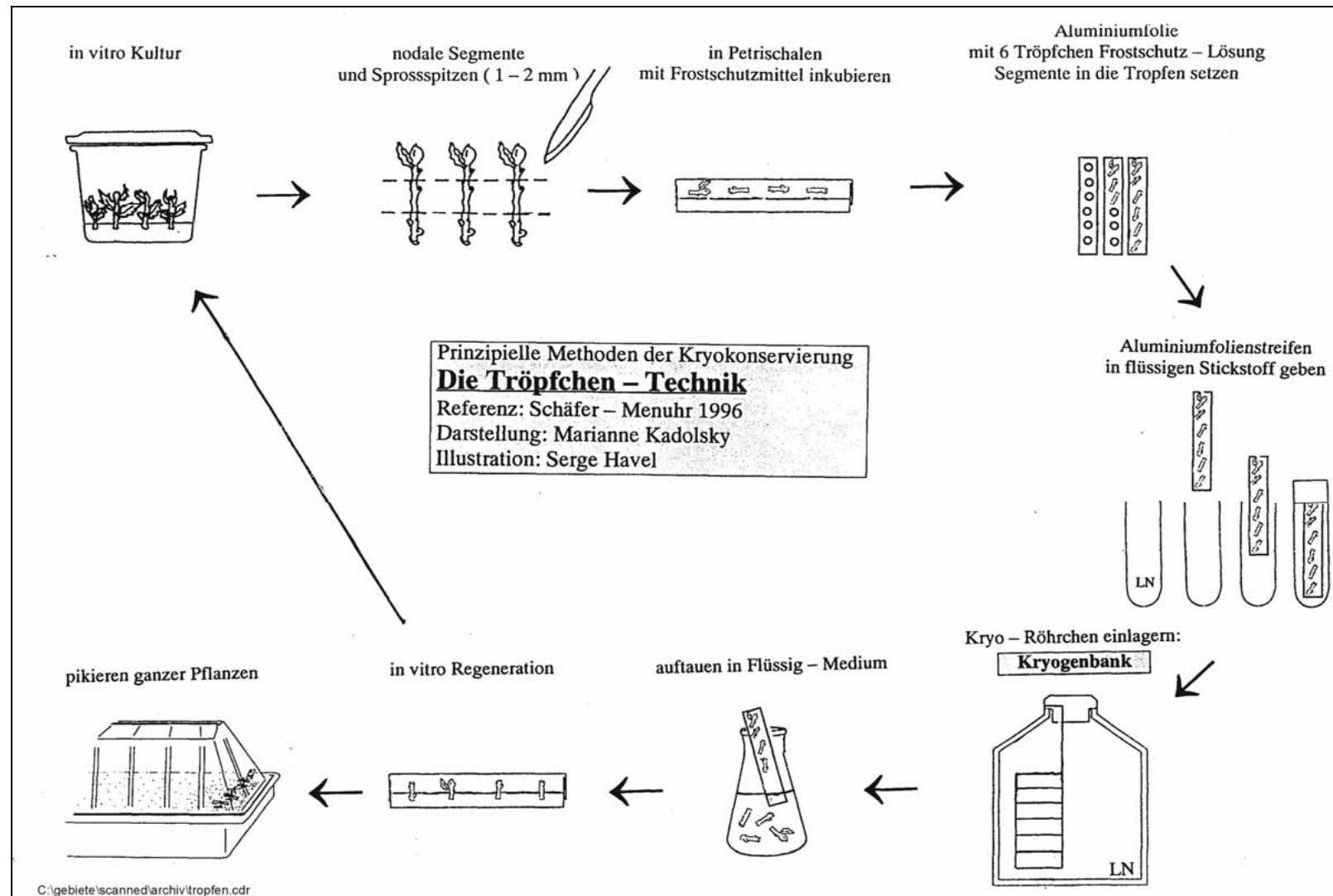


Abb. 45 Fließschema der Kryokonservierung von in vitro Material mittels Droplet-Methode (Tröpfchen-Technik).

Kryokonservierung und in vitro Kultur von *Pyrus pyrastra* (L.) BURGSD. und *Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ

Zusammenfassung

Die Erhaltung und Nutzung seltener, hochwertiger Baumarten ist in vielen Fällen nur mit Hilfe vegetativer Vermehrungsverfahren möglich. Zur langfristigen und sicheren ex situ Erhaltung ist die Kryokonservierung von vegetativem Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff bei -196°C geeignet. Ziele der vorliegenden Arbeit waren, für die beiden in ihrem Bestand gefährdeten Baumarten *Pyrus pyrastra* und *Sorbus torminalis* die in vitro Kultur zu optimieren, um eine kommerzielle Nutzung zu fördern, sowie Kryokonservierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit hin zu evaluieren. Mit *Sorbus torminalis* wurde Kryokonservierung erstmalig durchgeführt.

Von beiden Baumarten wurden in vitro Kulturen von ausgewählten Individuen etabliert. Als Explantatquellen dienten ruhende Winterknospen von ca. 10-jährigen Bäumen aus Nachkommenschaftsprüfungen oder von Pflöpfen alter Bäume (bis 200 Jahre) von Originalstandorten. Für die Optimierung der in vitro Kultur wurden neben Nährmedien-Screenings folgende Faktoren untersucht: der Einfluss des Kulturgefäßes (Honiggläser an Stelle der üblichen Weckgläser), die Schneidetechnik in der Vermehrungsphase (mononodiale Sprosssegmente versus Einzelsprosse), Temperaturabsenkung während der Bewurzelungsphase, Länge des Mikrostecklings für die Bewurzelung, der Pikiertetermin.

Ein umfangreicher Versuch zum Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung zeigte, dass der physiologische Zustand der Ausgangspflanzen ein entscheidender Faktor ist. Bei beiden Baumarten wurden je 3 Genotypen aus Nachkommenschaftsprüfungen dafür verwendet. Die Reiser mit den als Explantatquelle dienenden Winterknospen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Jahren im November, Dezember, Januar, Februar und März jeweils zur Monatsmitte geerntet und sofort in die in vitro Kultur überführt. Außerdem wurden von jedem Erntetermin Reiser für 2 Monate bei +5°C gelagert und anschließend in die in vitro Kultur überführt. Bei *Pyrus pyrastra* zeigte sich, dass alle Kennzahlen der in vitro Kultur durch den Erntetermin beeinflusst wurden: Etablierungsraten, Etablierungsdauer, Vermehrungskoeffizienten und Akklimatisierungsraten. Diese Kulturkennzahlen wurden in einer Berechnung, bei der alle Erntetermine für den Zeitpunkt Null angenommen wurden, zueinander in Beziehung gesetzt. Daraus ergab sich die für die fiktive Produktion von 1000 Pflanzen benötigte Zeit und Anzahl Transfers. Die beste Variante mit der kürzesten Produktionszeit und wenigsten Transfers war der Erntetermin Anfang bis Mitte März in Kombination mit 2-monatiger Lagerung der Reiser.

Die in vitro Kultur von *Sorbus torminalis* wurde ebenfalls stark vom Reisererntetermin und der Reiserlagerung beeinflusst. Aber die Ergebnisse zwischen den Jahren differierten stark und waren nicht vergleichbar.

Versuche zur Kryokonservierung wurden mit in vitro Material und mit Winterknospen durchgeführt. Reiser mit Winterknospen wurden schrittweise auf -30°C heruntergekühlt und dann in Flüssigstickstoff überführt. Sie zeigten nach dem Auftauen bei Raumtemperatur Vitalitätsraten bis zu 100%, geprüft mit dem Triphenyl-Tetrazoliumchlorid-(TTC-)Test. Dieser Schnelltest zur Ermittlung der Vitalität nach dem Gefrieren stand in keiner Beziehung zum Sprossregenerationsvermögen der Explantate. Bei *Sorbus torminalis* war der TTC-Test nicht anwendbar, da vitales Gewebe nicht mit dem Farbstoff reagierte.

Der Einfluss des Reisererntetermins und der Reiserlagerung wurde in Kombination mit Kryokonservierung nach dem gleichen Versuchsplan wie oben beschrieben geprüft. Bei *Pyrus pyraeaster* erfolgte bei 5 Varianten Sprossregeneration. Die Reisererntetermine lagen zwischen November und Januar. Die Reiserlagerung wirkte positiv. Alle drei geprüften Klone wurden etabliert. Bei *Sorbus torminalis* führten 3 Varianten zu Sprossregeneration. Die Reisererntetermine waren Dezember ohne Reiserlagerung, sowie Januar sowohl mit als auch ohne Reiserlagerung. Es wurden 2 der 3 geprüften Klone etabliert. Dies ist die erste Beschreibung einer erfolgreichen Kryokonservierung von *Sorbus torminalis*.

Die Anwendung der beschriebenen Kryokonservierungsmethode von Winterknospen auf *Prunus avium* war negativ, obwohl die in vitro Kultur ohne Kryokonservierung zu jedem Erntetermin mit und ohne Reiserlagerung möglich war.

Eine Machbarkeitsstudie zur Kryokonservierung von in vitro Material beinhaltete die Methode der Einkapselung in Alginatkugeln und die Droplet-Technik. Bei *Pyrus pyraeaster* führte das Einkapseln von Apices in Alginatkugeln mit anschließender Trocknung auf 61% des Frischgewichts zum Absterben. Die gleiche Behandlung beeinträchtigte die Sprossbildung von *Sorbus torminalis* – Apices nicht, wenn sie mit 4-wöchiger Vorkultur bei +4°C kombiniert war. Die beste Trocknungsmethode für Alginatkugeln war über Silicagel. Sie wurde stark von der Größe und Form der Alginatkugeln beeinflusst und war daher schlecht reproduzierbar. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Methode als ungeeignet eingestuft.

Ein Screening von Vorbehandlungsmethoden für die Droplet-Technik ergab für *Pyrus pyraeaster* Kombinationen von Vorbehandlungen, die keiner der bisher veröffentlichten Methoden entspricht. Bei folgendem Vorgehen wurden Vitalitätsraten zwischen 7 und 13% nach Kryokonservierung, geprüft mit 3 Klonen und nachgewiesen durch in vitro Sprossregeneration, ermittelt: Apices von Sprosskulturen als Startmaterial, 20 Stunden bei 0°C vorgekühlt, Vorinkubation (optional) für 20 Minuten in MS-Flüssigmedium mit 0,4 M Saccharose und 2,0 M Glycerin, Inkubation in PVS2-Vitrifizierungslösung für 5, bzw. 15 Minuten, Einfrieren in Flüssigstickstoff in einem Tropfen PVS2-Lösung auf einen Aluminiumstreifen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Droplet-Technik als praktikable Methode eingestuft.

Die Kennzahlen der in vitro Kulturen von *Pyrus pyraeaster* wurden nach Kryokonservierung mit denen ohne Kryokonservierung verglichen. Es wurden weder positive noch negative Einflüsse der Kryokonservierung festgestellt.

Ruhende Winterknospen von *Pyrus pyraeaster* und *Sorbus torminalis* haben sich als geeignetes Ausgangsmaterial für die in vitro Kultur und die Kryokonservierung in Kombination mit in vitro Kultur erwiesen. Der physiologische Status der Winterknospen, die Dormanz, ist je nach Zeitpunkt der Reiserernte verschieden. Ein Problem besteht in der Diskrepanz zwischen der Nutzung der tiefen Dormanz der Knospen und des damit verbundenen natürlichen Frostschutzes für die Kryokonservierung und der Vermeidung von zu tiefer Dormanz bei der Etablierung von in vitro Kulturen, weil sie das Wachstum in vitro stark behindern kann. Für die verschiedenen Anwendungszwecke geeignete Reisererntetermine wurden genannt. Die erreichten Kulturkennzahlen erlauben eine kommerzielle in vitro Vermehrung von *Pyrus pyraeaster*. Für die Kryokonservierung mit dem Ziel des Aufbaus einer Kryogenbank wurden für *Pyrus pyraeaster* die Möglichkeiten erweitert und für *Sorbus torminalis* die Grundlagen gelegt.

Cryopreservation and in vitro culture of *Pyrus pyraister* (L.) BURGSD. and *Sorbus torminalis* (L.) CRANTZ

Abstract

In many cases the conservation and utilization of rare valuable tree species is only possible by methods of vegetative propagation. Cryopreservation in liquid nitrogen at -196°C is a suitable technique for the safe and long-term conservation ex situ of vegetative plant material. The aim of the study presented was to optimize the tissue culture protocol of the two endangered tree species *Pyrus pyraister* and *Sorbus torminalis* in order to promote commercial utilization. In a feasibility-study methods of cryopreservation were to be evaluated. For *Sorbus torminalis* cryopreservation was to be conducted for the first time.

In vitro cultures were successfully established of both tree species. Explants were taken from dormant winter buds of c. ten-year-old trees from progeny trials or from grafts of old trees (up to 200 years). Optimization of the protocol was achieved by screenings of media and by investigation of the following factors: type of culture vessel (honey jars instead of Weck-jars), cutting technique during the propagation phase (mononodial segments of shoots versus single shoots), temperature reduction during the rooting phase, length of microcutting for rooting, date of pricking.

An extensive experiment on the influence of the harvest date of twigs and their storage revealed that the physiological condition of the donor plants is an overall important factor. Twigs with winter buds which served as explants sources were harvested in two subsequent years in November, December, January, February and March in the middle of the month. They were taken into in vitro culture immediately after harvest and two months later once more after storage at +5°C. It was shown for *Pyrus pyraister* that all performance figures of in vitro culture were influenced by the harvest date: rates of establishing, duration of establishing, coefficient of multiplication, rate of acclimatization. These culture ratios were correlated in a calculation in which all harvest dates were reset to a date zero from which the period and the number of transfers was calculated that was needed to produce a fictitious quantity of 1000 plants. The best variant with the shortest period and the least number of transfers was the harvest date beginning to middle of March and two months storage of the twigs.

In vitro culture of *Sorbus torminalis* was also strongly influenced by harvest date and storage of twigs. However, the results between years differed and were not comparable.

Cryopreservation methods were evaluated by using in vitro material and winter buds. Twigs with winter buds were cooled down stepwise to -30°C prior to storage in liquid nitrogen. After rewarming at room temperature vitality was up to 100% as indicated by the triphenyl-tetrazoliumchloride- (TTC-) test. This quick test for the estimation of vitality after freezing showed no relation to the regeneration ability of the plants. In *Sorbus torminalis* the TTC-test was not applicable since vital controls did not react with the dye.

The influence of the harvest date of twigs and their storage, as described above, was investigated in combination with cryopreservation. In *Pyrus pyraister* five variants lead to proliferating shoot cultures, the harvest dates being November, December and January with a positive influence of the storage of the twigs. All three genotypes tested were established. In *Sorbus torminalis* three variants lead to proliferating shoot cultures, the harvest dates being

December without storage of the twigs and January both with and without storage. Two of three tested genotypes were established. This is the first description of successful cryopreservation of *Sorbus torminalis*.

The application of the described cryopreservation method to *Prunus avium* failed while tissue culture without cryopreservation was successful at each harvest date with and without storage.

A feasibility study in cryopreservation of in vitro material entailed the method of encapsulation in alginate beads and the droplet technique. In *Pyrus pyraeaster*, encapsulation of apices in alginate beads followed by drying to 61% fresh weight lead to dying off. *Sorbus torminalis* shoots kept on proliferating when the treatment was combined with four weeks hardening at +4°C. The best drying methods for alginate beads was over silica gel, but proved to be strongly influenced by the size and shape of the beads and was therefore difficult to reproduce. Due to these results this method was considered unsuitable.

A screening of pre-treatment methods for the droplet technique resulted in a combination of pre-treatments for *Pyrus pyraeaster*. Vitality rates of 7 to 13% after cryopreservation were achieved by the following protocol: Apices of shoot cultures as starting material, precooled at 0°C for 20 hours, pre-incubated (optional) in MS liquid medium with 0,4 M sucrose and 2,0 M glycerine, incubated in PVS2-vitrification solution for 5 and 15 minutes, respectively, frozen in a droplet of PVS2-solution placed on a strip of aluminium that is plunged in liquid nitrogen. The method was considered suitable. This combination of treatments for *Pyrus pyraeaster* is published for the first time.

The in vitro culture ratios of *Pyrus pyraeaster* after cryopreservation were compared with those prior to cryopreservation. Neither positive nor negative influences of cryopreservation were found.

Dormant winter buds of *Pyrus pyraeaster* and *Sorbus torminalis* proved to be a suitable source of starting material for in vitro culture as well as for cryopreservation followed by in vitro culture. The physiological status of the winter buds, the dormancy, varies and depends on the harvest date of twigs. A problem remains in the discrepancy of the dormancy in buds being recognized as the major factor that impedes in vitro culture while at the same time dormant buds show a natural protection against frost damage which is needed for cryopreservation. Suitable harvest dates are given for the different purposes. Culture ratios were achieved that allow commercial in vitro culture as a means of conservation by utilization. For cryopreservation with the object of establishing a cryo-genebank the alternatives for *Pyrus pyraeaster* have been enlarged while for *Sorbus torminalis* a basis is provided.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Dresden, den 9. Dezember 2005

Marianne Kadolsky

Danksagung

Herrn Dr. A. Meier-Dinkel danke ich für die Betreuung der Arbeit. Seine Geduld, Diskussionsbereitschaft, fachlichen Ratschläge und optimistische Grundeinstellung haben mir über manche Durststrecke hinweg geholfen.

Herrn Dr. J. Kleinschmit danke ich für die Überlassung des Themas. Ohne seine Visionen von der Erhaltung der Waldgenressourcen durch Nutzung wäre das Projekt nicht zustande gekommen.

Herrn Prof. Dr. F. Pohlheim danke ich dafür, dass er mich als adulte Doktorandin mit einer fast fertigen Dissertation noch unter seine Fittiche genommen hat und unerschütterlich an das Gelingen meines Vorhabens glaubte.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt in Escherode für die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft, insbesondere Frau C. Stünkel für ihre technische Assistenz und die stets zuverlässige Betreuung vieler Versuche.

Ebenso danke ich allen Freunden und Kollegen, die mich in vielfältiger Weise, besonders beim Korrektur-Lesen des Manuskripts, unterstützt haben und mich immer wieder aufgemuntert haben, wenn die berufliche Belastung die Oberhand über den Willen zur Fertigstellung der Arbeit zu gewinnen drohte.

Nicht zuletzt danke ich meiner Mutter. Sie hat mich zu nicht nachlassender Neugier auf die Wunder der Natur erzogen.